THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Denise BUFFÉ

1re THÈSE : Étude de la formation des immunoglobulines chez l'homme en fonction de l'âge et de la structure immunochimique de ces protéines.

2e THÈSE : Propositions données par la Faculté : Les immunoglobulines et les groupes Gm. dans les myélomes.

Soutenues le 18 Juin 1965, devant la Commission d'examen.

MM. PRENANT *Président.*
DUBERT
GRABAR *Examinateurs.*
BURTIN

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1967

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Denise BUFFÉ

1re THÈSE : Étude de la formation des immunoglobulines chez l'homme en fonction de l'âge et de la structure immunochimique de ces protéines.

2e THÈSE : Propositions données par la Faculté : Les immunoglobulines et les groupes Gm. dans les myélomes.

Soutenues le 18 Juin 1965, devant la Commission d'examen.

MM. PRENANT *Président.*
DUBERT
GRABAR *Examinateurs.*
BURTIN

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME
—
1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY.

BRELOT ..... T Analyse supérieure.
PRENANT ..... T Anatomie et Histologie comparées.
GRASSÉ ..... T Evolution des êtres organisés.
PRÉVOST ..... T Chimie organique.
WYART ..... T Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER ..... T Zoologie.
MANGENOT ..... T Biologie végétale (Orsay).
AUGER ..... T Physique quantique et relativité.
MONNIER ..... T Physiologie générale.
PIVETEAU ..... T Paléontologie.
ROCARD ..... T Physique E.N.S.
CARTAN ..... T Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE ..... T Chimie générale.
N ..... T Géométrie supérieure.
COULOMB ..... T Physique du globe.
Mlle COUSIN ..... T Biologie anim. S P.C.N.
CHRÉTIEN ..... T Chimie minérale.
BOCQUET ..... T Zoologie.
KASTLER ..... T Physique E.N.S.
EPHRUSSI ..... T Génétique.
RIVIÈRE ..... T Géologie S.P.C.N. et sédim. (Orsay).
GAUTHERET ..... T Biologie végét. P.C.B.
LUCAS R. ..... T Recherches physiques.
THOMAS A. ..... T Biologie cellulaire.
ARNULF ..... T Optique appliquée.
MORAND. ..... T Physique Enseignement.
SOLEILLET ..... T Physique. P.C.B.
FORTIER ..... T Mécanique expérimentale des fluides.
DRACH. ..... T Zoologie.
QUENEY ..... T Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN ..... T Embryologie.
EICHHORN ..... T Botanique.
DE CUGNAC ..... T Biologie végét. S.P.C.N.
Mlle CAUCHOIS ... T Chimie-Physique.
THELLIER ..... T Physique du Globe.
L'HÉRITIER ..... T Biologie générale (Orsay).
GRIVET ..... T Radioélectricité (Orsay).
PONCIN ..... T Mécanique générale.
DU BREIL. ..... T Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET ..... T Chimie organique.
CAGNIARD ..... T Géophysique appliquée.
CHAMPETIER ..... T Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER ..... T Micropaléontologie.
JUNG ..... T Géologie.
TRILLAT ..... T Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN ..... T Chimie organique structurale.
JACQUINOT ..... T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY ..... T Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES ..... T Théories physiques.
AMIEL ..... T Chimie génér.
HOCART ..... T Minéralogie et Cristallographie.
J.-P. MATHIEU.... T Physique Optique.
COUTEAUX ..... T Cytologie.
MAY ..... T Zoologie
CHOQUET ..... T Théor. des fonct. et topologie.
FELDMANN ..... T Biologie végétale marine.
GUINIER ..... T Physique des solides (Orsay).
JOST ..... T Physiol. comparée.
FORTET ..... T Calcul des probabilités et Phys. math.
SCHWARTZ ..... T Calcul différentiel et intégral.
CHOUARD ..... T Physiologie Végétale.
MALAVARD ..... T Aviation (Tech. aéronaut)
NORMANT ..... T Synthèse organique.
BENARD ..... T Chimie minérale.
BUVAT ..... T Botanique E.N.S.
DUGUE ..... T Statistiques Math.
SOULAIRAC ..... T Psychophysiologie.
ULRICH ..... T Physiol. végétale appl.
MARÉCHAL ..... T Optique théorique et appl.
KIRRMANN ..... T Théories chimiques.
CHADEFAUD ..... T Botanique.
Mlle LE BRETON... T Physiologie de la nutrition.
LELONG ..... T Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS ..... T Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN ..... T Topologie algébrique.
FRANÇON. ..... T Physique S.P.C.N.
GLANGEAUD..... T Géographie physique et Géologie.
DODEMENT ..... T Mathématiques M.G.P.
PISOT ..... T Technique mathématique de la physique.
ROCH ..... T Géologie.
SCHATZMANN ..... T Astrophysique.
TERMIER ..... T Géologie générale.
ZAMANSKY ..... T Mathématiques générales.
LENNUIER ..... T Physique M.G.P.
RIZET ..... T Génétique (Orsay).
ROUTHIER. ..... T Géologie appliquée.
Mme TONNELAT ... T Physique théorique.
DIXMIER ..... T Mathématiques M.P.C.

Souchay	T	Chimie générale.
Aigrain	T	Electrotechnique générale.
Brusset	T	Chimie systématique.
M. Lévy	T	Physique théorique des hautes énergies. (Orsay).
Mme Chaix	T	Chimie biologique.
Mme Hurel-Py	T	Biologie végétale P.C.B
Pannetier	T	Chimie générale.
Brun	T	Mécan. des fluides I.
Lederer	T	Chimie biologique (Orsay).
Mme Dubreil	T	Mathématiques (Agrégation).
Mme Lelong	T	Mathémat. II E.N.S.
Bellair	T	Géologie S.P.C.N.
Cotte	T	Physique électricité.
Dubois J.-E.	T	Chimie organique.
Lamotte	T	Zoologie E.N.S.
Michel A.	T	Chimie minérale (Orsay).
Olmer	T	Energétique générale.
Rouault	T	Electricité (Orsay).
Gauthier	T	Mécanique appliquée.
Barchewitz	T	Chimie physique.
Brossel	T	Physique atomique.
Buser	T	Physiologie comparée.
Camus	T	Physiologie végét. (Ors.).
Castaing	T	Phys. II thermo. (Orsay).
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie.
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay).
Mme Charniaux-Cotton	T	Evolution des êtres organisés.
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique (Orsay).
Ville	T	Econométrie.
Willemart	T	Chimie P.C.B.
Dodé	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet	T	Biologie vég. S.P.C.N. (Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie S.P.C.N.
Chevalley	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay).
Germain P.	T	Mécanique théorique des fluides.
Lucas G.	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Phys. des particules fondamentales (Orsay).
Bricard	T	Météorologie et physique de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard	T	Psycho-physiologie.
Friedel	T	Physique des solides (Orsay).
M. Julia	T	Etudes des moléculaires complexes.
Lender	T	Biologie animale S.P.C.N. Orsay.
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments
Mlle Quintin	T	Electrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiologie animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemee	T	Ecologie Vég. (Orsay).
Guerin	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
Chatelet M.	T	Chimie P.C.B.
Jean.	T	Physique nucléaire (Orsay)
Mattler	T	Physique S.P.C.N.
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Electronique (Orsay).
Bouissieres	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Thermodynamique et Méc an. physique.
Ellenberger	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
Franc.	T	Biologie animale P.C.B.
Schnell		Botanique tropicale.
Stolkowski.	T	Physiologie végétale.
Acher.	T	Chimie biologique.
Baudoin	T	Biologie animale P.C.B.
Beaumont		Biologie animale S.P.C N.
Blamont		Géophysique ionosphère.
Boureau	T	Botanique.
Curie D.		Physique M.G.P.
Durand-Delga	T	Géologie.
Freon	T	Chimie organique (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat.	T	Calcul des Probabilités.
Cailleux	T	Géologie S.P.C.N.
Magnan		Physique électricité.
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théor. et la Phys. nucléaire.
Mlle Fourcroy		Biologie végétale S P.C N.
Mme Choquet-Bruhat	T	Méc. analytique et Méc. céleste.
Mlle Veil	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécan. physique et expérimentale.
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
Brochard	T	Physique P.C.B. (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay).
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie physique et Géologie dyn.
Comolet	T	Mécanique des Fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale (Orsay).
Delloue	T	Physique de l'Exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale P.C B.
Jullien J.		Chimie SPCN (Orsay).
Malgrange	T	Technique mathématique de la Phys. (Orsay).
Olivier		Anthropologie.

Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique E.N.S. (Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathématiques ENS féminines.
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique SPCN.
Amat	T	Physique PCB.
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal	T	Phys. Nucléaire et radioactivité (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer.)
Bruhat	T	Mathématiques MPC.
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabral	T	Physique MGP (Orsay).
Deheuvels	T	Mathématique Propé.
D'Espagnat	T	Physique théorique (Orsay).
Furon	T	Géologie SPCN.
Mme Gans	T	Génétique.
Geneves		Biologie végétale PCB.
Guilbert		Physique (CUS Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie PCB.
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétographie.
Roseau	T	Méca. théor. des fluides.
Roubine		Electronique.
Silber	T	Chimie PCB.
Uebersfeld	T	Electronique.
Yvon	T	Théories Physiques.
Herve	T	Mathématiques.
Neron	T	Mathémat. MPC (Orsay).
Mme Pecker-Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique MPC.
Le Corre	T	Electricité.
Delcroix	T	Physique théorique (Orsay).
Gourdin		Phys. Théor. des Hautes-Energies (Orsay).
Lehmann	T	Phys. Exp. des Hautes-Energies (Orsay).
Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Echalier		Biologie animale PCB.
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret		Physiologie végét. Orsay.
Dars		Géologie struc. et Geol. appliquée.
Camefort	T	Botanique ((agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Blaquiere		Electronique (Orsay).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (CSU Orléans).
Malliavin	T	Mathématique propé. (Orsay).
Gaudemar		Chimie Propéd.
Perez y Jorba		Phys. Exp. des Hautes énergies (Orsay).
David	T	Chimie (Agrég. Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérimentale.
Lazard		Math. M.P.C.
Morel Pierre		Physique M.P.C.
Arsac		Programmation.
Lefebvre		Chimie M.P.C.
Chapeville		Biochimie.
Benoit		Physique C.P.E.M.
Rio		Chimie C.P.E.M.
Jauzein		Géologie. E.N.S.
Prevost Georges		B.V. C.P.E.M.
Favard P.		B.A. C.P.E.M.
Vilkas		Chimie C.P.E.M.
Mlle Ficini		Chimie C.P.E.M
Lequeux		Astronomie.
Cohen Tannoudji		Physique M.P.C.
Tavernier		Physique C.P.E.M.
Mme Roizen		Physique C.P.E.M.
Durand M.		B.A. S.P.C.N.
Pascaud		Physiologie.
Mme Petit		B.A. C.P.E.M.
Brousse		Géologie (Orsay)
Cagniac		Physique (agrégation Orsay).
Leberre		Zoologie (Orsay).
Schaeffer		Microbiologie (Orsay).
De Gennes		Physique des solides (Orsay).
Riou		Physique nuclé. exp. (Orsay).
Clauser		Chimie biolo. (Orsay).
Chevalier		Physio. animale (Orsay).
Jancovici		Physique atomique (Orsay).
Falk-Vairant		Physique nucléaire (Orsay).
Fetizon		Chimie propé. (Orsay).
Cerf		Mathématiques (Orsay).
Lurcat		Physique.
Rigaudy		Chimie S.P.C.N.
Sigwalt		Chimie S.P.C.N.
Fouknet		Electricité générale.
Collongues		Chimie C.P.E.N.
Dubebt		Biochimie.
Lavokel		Biologie physico-chim.
Morel F.		Physiologie comparée.
Talbot		Génétique chimique.
Mme Nougarede		Botanique.
François		Zoologie.
Ivanoff		Océanographie physique.
Cadiot		Chimie organique.
Baruch		Physique propédeutique.
Nozières		Physique générale.
Bok		Physique propédeutique.
Slonimski		Génétique.

Secrétaire Général..... R. Poullain.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544306_0056

INTRODUCTION

Les immunoglobulines, terme sous lequel HEREMANS [58] en 1959 regroupait trois protéines du plasma étroitement unies par leur rôle dans l'immunité, ont fait l'objet de nombreux travaux depuis quelques années.

Ces protéines, γ, β_2A, β_2M globulines, ou pour adopter la dernière nomenclature proposée à Prague en juin 1964, IgG, IgA, IgM, ne sont pas seulement reliées par leur fonction mais également par leur structure (Tableau n° 1). En plus d'une structure antigénique propre à chacune d'elles, elles présentent une structure commune, ainsi que l'ont mis en évidence d'importantes études chimiques et immunologiques dont nous allons essayer de faire la synthèse ici :

Les immunoglobulines G ou γ globulines que l'on trouvera aussi sous le terme γ_2 ou γ_{7S} à cause de leur constante de sédimentation ont un poids moléculaire de 160 000. Elles sont formées de molécules dont la migration électrophorétique s'étend sur les zones γ et β. Leur structure antigénique est complexe ; elle a été particulièrement bien étudiée dans différentes espèces animales.

PORTER [91] en dégradant les γ globulines de lapin par la papaïne a isolé trois fragments : les fragments I et II portant l'activité anticorps et un fragment III.

FRANKLIN [45] et PUTNAM [92] ont pu mettre en évidence de la même façon 3 fragments A, B et C dans les immunoglobulines G humaines : les fragments A et C correspondant à peu près aux fragments I et II de PORTER et le fragment B correspondant au III^e fragment.

Du point de vue mobilité électrophorétique après dégradation enzymatique, les immunoglobulines G peuvent être séparées en 2 zones,

TABLEAU I.

Nomenclature des immunoglobulines.

Nomenclature adoptée à Prague 1964	Différentes dénominations utilisées
IgG ou γG Immunoglobuline G	γ globuline, γ_{7S}, γ_2, $\gamma_2$7S, γ_{8S}
IgA ou γA Immunoglobuline A	β_2A globuline, γ_1A, $\beta_2$7S
IgM ou γM Immunoglobuline M	β_2M globuline, β_2 macroglobuline, γ_{19S}, γ_{1M}, $\beta_2$19S

1 lente S (slow) où migrent les fragments A et C et 1 rapide, F (fast) zone de migration du III^e fragment, B.

Par l'action du mercapto-éthanol en présence d'urée, EDELMAN et POULIK [34] ont scindé les molécules des immunoglobulines G en deux

groupes de chaînes polypeptidiques séparées selon leur poids moléculaire en chaînes lourdes H : Heavy, poids moléculaire d'environ 50 000 et en chaînes légères L : Light, poids moléculaire d'environ 20 000. Chaque molécule d'immunoglobulines G serait constituée de deux chaînes lourdes et deux ou quatre chaînes légères selon les auteurs, unies par des ponts disulfures (Tableau n° 2).

TABLEAU II.

Structure des immunoglobulines basée sur la dégradation enzymatique.

Fragments		Mobilité électrophorétique	Poids moléculaires	Activité anticorps (*)	Déterminants antigéniques	Déterminants génétiques
I	A	lente (S)	environ 20.000 léger (L)	+	communs : γG, γA, γM	Inv
II	C		environ 20.000	+		
III	B	rapide (F)	lourd (H) 50.000	—	particulier à chaque IG	Gm
(PORTER)	(FRANKLIN)		(EDELMAN)			

(*) *N. B.* : Séparation un peu schématique, chaque fragment porteur de site anticorps I ou II est formé d'une chaîne légère L et d'un morceau de chaîne lourde H.

L'Immunoglobuline A ou $\beta_2 A$ globuline également trouvée dans la littérature sous le terme γ_1A est une protéine de même poids moléculaire que les immunoglobulines G, 160 000, et de constante de sédimentation voisine de 6,5 à 7,5. Elle n'est pas homogène du point de vue moléculaire. Dès 1955 WILLIAMS et GRABAR [115] signalèrent une certaine hétérogénéité électrophorétique. Elle est comme les deux autres immunoglobulines représentée par toute une famille de mobilité variée. Elle peut donner des polymères ayant des constantes de sédimentation de 9 à 13 S et dissociables par les composés sulfhydrylés. Comme les immunoglobulines G et l'immunoglobuline M, elle est faite de chaînes légères et lourdes, dissociables par le mercapto-éthanol. Elle présente la même hétérogénéité antigénique liée aux chaînes légères.

L'immunoglobuline M ou β_2 macroglobuline, ou γ_1M, ou encore γ_{19S} d'après sa constante de sédimentation est une macroglobuline dont le poids moléculaire est de un million ; elle peut être dissociée par les composés sulfhydrylés (cystéine, mercapto-éthanol) en monomères de poids moléculaire 160 000 et de constante de sédimentation voisine de 6,5 S. (DEUTSCH et MORTON, 1957 [32]).

Comme les deux autres immunoglobulines, l'immunoglobuline M est antigéniquement hétérogène, elle contient les différents types de chaînes légères et lourdes.

En 1957, Franklin et Kunkel [46] ont montré qu'elle possédait des déterminants antigéniques communs aux immunoglobulines G et en 1960 Heremans [59] a montré la présence de déterminants communs immunoglobuline A et immunoglobuline M, immunoglobulines G et immunoglobuline A. Les travaux d'Edelman et Coll. [33, 35] ont permis d'établir que les déterminants antigéniques qui sont communs aux trois types de protéines et qui sont responsables de leur réactivité croisée partielle sont présents sur les fragments A et C de Franklin et Stanworth [47, 48], de mobilité électrophorétique lente (tableau n° 2). Ces déterminants communs sont portés par les chaînes légères dont il existe au moins deux types K (I) et λ (II) et probablement plus. On peut distinguer les immunoglobulines de type I et II, suivant le type de chaînes légères que renferme la molécule [73, 74].

Cette communauté de structure se retrouve également du point de vue génétique, et, la découverte de l'allotypie par Oudin [89, 90] chez le lapin a objectivé un nouvel aspect de l'hétérogénéité des immunoglobulines. Après la première série d'allèles Gm découverte par Grubb [56, 57] en 1956 et localisés sur le fragment III (B) et la chaîne lourde des γ globulines (Franklin, Fudenberg et alii [49]), Ropartz et Coll. [96] ont récemment mis en évidence une deuxième série d'allèles désignés par les symboles Inv (a) et Inv (b). Ces déterminants Inv sont portés par les chaînes légères I et II, et présents dans les trois types d'immunoglobulines.

La fonction immunologique des immunoglobulines est bien connue. Elles servent de support à des anticorps de spécificités différentes, suivant l'immunoglobuline considérée, mais toujours en relation avec la fraction lente obtenue après hydrolyse par la papaïne (Edelman et coll. [33, 34, 35]), le maximum d'activité semblant résulter de l'interaction chaîne légères et lourdes (Edelman 1963, Franek [44], Olins [84, 85], Metzger [76].

Elles interviennent dans les réactions d'immunité et d'hypersensibilité à des degrés ou à des stades différents. Elles semblent avoir la même origine cellulaire : tous les travaux concourent actuellement pour attribuer aux cellules lymphoïdes l'élaboration des anticorps.

En effet, dès 1935 MacMaster et Hudack [70] constatent chez la souris immunisée l'hyperplasie du tissu lymphoïde en même temps qu'un taux accru d'anticorps dans la lymphe efferente des ganglions. Ces observations sont confirmées par Oakley [83] qui montre qu'après injection sous cutanée d'un antigène, la plupart des anticorps sont produits par les ganglions régionaux. Vers 1937, l'attention est attirée sur le rôle particulier des plasmocytes ce que confirment par des procédés différents, les expériences de Bjoerneboe en 1943 et 1947 [12, 13], de Fagraeus en 1947 [39] et plus récemment de Madame Grabar [55].

Les rapports entre les anticorps et les immunoglobulines G sériques ont été établis dès 1939 par Tiselius et Kabat [109] et assez vite on a montré les relations entre la formation des immunoglobulines G et

l'activité des plasmocytes. Le fait le plus important a été observé en 1940 par Bing et Plum [9, 10, 11] qui ont établi une corrélation entre l'hyperglobulinémie et la présence, en proportion anormale, de plasmocytes chez l'homme au cours de différentes affections. La contre épreuve a été réalisée récemment par Lane [64], l'ablation d'une tumeur isolée à plasmocyte a été suivie d'un retour progressif à la normale du taux des immunoglobulines G sériques.

De nombreux auteurs ont confirmé cette corrélation hypergammaglobulinémie-plasmocyte (Andersen [1], Undritz [111], Rohr [95], Wuhrman [116], Kagan [61], Cardon et Atlas [25], Magnus-Levy [71]). Inversement une diminution plus ou moins importante, ou même une disparition quasi complète de IgG, IgA, IgM globulines telles qu'on l'observe dans les agammaglobulinémies congénitales est associée à une déficience tissulaire en plasmocyte (Good [59], Gitlin [51]).

Enfin la richesse du plasmocyte et en particulier du plasmoblaste en ribonucléotides indique pour Casperson [26] que cette cellule a une activité importante de synthèse protéique, ce que semble confirmer la microscopie électronique qui montre les analogies de structure entre le plasmocyte et les cellules glandulaires.

Toutes ces constatations ont suscité de nombreux travaux sur l'origine cellulaire des anticorps avec des techniques très différentes. Ces études ont été faites sur l'animal (Leduc [65], Coons [31], Askonas [4], White [114], Thorbecke [105, 106, 107, 108], Attardi [6], Ortega [86], et Mellors [75]) ou sur des cellules isolées (Nossal [79, 81, 82], Cohn [28], Levene [67]). Elles ne concernent les immunoglobulines et presque uniquement les immunoglobulines G qu'en tant que support d'anticorps. C'est pourquoi il nous a paru intéressant devant les récentes acquisitions sur la structure des immunoglobulines humaines de reprendre ce problème, et d'essayer de répondre aux questions suivantes :

1. — Y-a-t-il une différenciation suivant l'immunoglobuline de telle sorte qu'on puisse poser l'équation :

une cellule = une immunoglobuline,

ou la même cellule peut-elle au même moment contenir indifféremment, une, deux, ou les trois immunoglobulines ?

2. — Nous savons qu'une cellule isolée peut synthétiser des anticorps (Nossal [79, 81, 82], qu'elle contient donc à la fois chaînes légères et chaînes lourdes. Ces deux chaînes sont-elles synthétisées en même temps dans la cellule ou progressivement au cours d'une maturation immunologique en quelque sorte ? Va-t-on donc trouver toujours les deux types de chaînes dans une seule cellule, ou trouvera-t-on aussi des cellules ne contenant qu'un seul type de chaînes ?

3. — Enfin, on sait que les immunoglobulines G sériques constituent une famille hétérogène de globulines, hétérogénéité due aux chaînes légères. Il a été établi qu'il y avait approximativement 2/3 de molécule du type I pour 1/3 de molécule du type II. Retrouve-t-on cette hétérogénéité au niveau cellulaire ? Les différents types de chaînes légères sont-ils synthétisés dans une seule et même cellule ou dans des cellules différentes ?

Autant de questions pour lesquelles nous avons essayé de trouver une réponse en appliquant les techniques d'immunofluorescence à des frottis ou à des coupes d'organes lymphoïdes humains provenant de sujets adultes sains ou atteints de dysglobulinémie.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons essayé de préciser le lieu de synthèse des immunoglobulines en fonction de l'âge de l'individu : à partir de quel moment de la vie embryonnaire, dans quels organes et dans quel ordre apparaissent-elles ? Des expériences faites sur l'animal (Silverstein et Coll. [100, 101]) ont montré que l'organisme embryonnaire était capable de produire des anticorps. D'autre part, on sait que le nouveau-né humain est dépourvu d'IgA globuline sérique et que son taux d'IgG globuline et d'IgM globuline est extrêmement faible ; cette dernière apparaît plus rapidement au cours des trois premiers mois de la vie alors que le taux des IgG globulines n'est normal qu'entre 6 et 12 mois et celui de l'IgA globuline qu'entre 6 et 10 ans.

La synthèse cellulaire suit-elle cette évolution ou s'agit-il d'une libération progressive d'immunoglobulines déjà synthétisées. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons étudié les organes hématopoïétiques des fœtus humains à différents âges de la vie embryonnaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

La technique d'immunofluorescence telle qu'elle a été proposée par Coons en 1942 [29] associe la sensibilité et la spécificité des méthodes immunologiques à la précision de la microscopie. Mais ceci n'est exact que si les prélèvements histologiques sont aussi peu modifiés que possible par rapport au tissu normal et si l'antigène reste insoluble *in situ*, sans être dénaturé, conservant la possibilité de fixer l'anticorps. C'est pourquoi nous avons préféré les empreintes d'organes et les étalements cellulaires faits dès le prélèvement toutes les fois que cela a été possible.

Les frottis permettent en effet une localisation cytologique plus fine, un contrôle immédiat au microscope à contraste de phase et un repérage cellulaire plus aisé pour une identification cellulaire ultérieure après recoloration.

Néanmoins, pour compléter la localisation intracellulaire d'une étude histologique « organique », des fragments d'organes ont été prélevés et congelés immédiatement à — 70°, conservés à — 20° puis coupés au cryostat. L'état du tissu est contrôlé au microscope à contraste de phase et après coloration à l'hématéine-éosine de quelques échantillons.

I. — Organes.

Nous avons étudié la moelle osseuse, la rate, les ganglions de l'adulte et du fœtus, le thymus et le foie fœtal.

1. — Moelle osseuse.

Elle provient le plus souvent de sujets adultes atteints de dysglobulinémie, le nombre de plasmocytes plus grand dans ces cas per-

mettant une étude plus fructueuse. Quelques prélèvements ont été effectués chez des enfants.

Il s'agit dans la plupart des cas de moelle sternale, parfois de moelle iliaque. Nous avons eu quelques prélèvements de moelle osseuse d'amputation (tibia, humérus).

Enfin, les prélèvements de moelle fœtale ont été effectués au niveau du fémur. A titre tout à fait exceptionnel nous avons examiné des moelles costales ou vertébrales prélevées au cours d'autopsies précoces de jeunes enfants.

Le suc médullaire, dès l'aspiration est mélangé à une solution physiologique type liquide de Hanks - Earle hépariné à 1 pour 10 000, centrifugé 10 minutes à 800 tours par minute.

Le culot est lavé avec la même solution physiologique de façon à éliminer au mieux les globulines sériques.

Dans certains cas, lorsque les prélèvements sont trop sanglants, nous tentons une lyse partielle des hématies en lavant dans une solution hypotonique, solution physiologique diluée au 1/2 avec de l'eau distillée.

Après centrifugation la couche de globules enrichie en éléments blancs est étalée sur des lames pour préparation histologique en verre mince, les frottis sont séchés à l'air et fixés.

Un contrôle de l'étalement tant pour sa richesse en globules blancs que pour l'intégrité de ces cellules est fait en contraste de phase et après coloration au May-Grünwald-Giemsa. Il en est de même pour les étalements faits directement au lit des malades avant tout lavage des cellules. Ces étalements directs servent également au contrôle de la fluorescence cellulaire spontanée ou sans spécificité immunologique.

2. — Rate.

Tous les prélèvements ont donné lieu à des empreintes immédiatement après l'ablation de l'organe et à des coupes à froid à partir de fragments congelés à — 20°.

Nous avons étudié ainsi :

— *14 rates provenant de fœtus* âgés de 2 mois 1/2 à 6-7 mois.

— *6 rates de très jeunes enfants* provenant d'un enfant mort-né, prématuré de 7 mois, d'un autre prématuré ayant vécu 8 jours, de deux nouveau-nés de 2 et 3 semaines, de deux bébés de 2 mois 1/2 et 5 mois.

— *5 rates d'enfants* de 5 à 8 ans décédés de leucémies aiguës, lymphosarcome ou neuroblastomes.

— *26 rates de sujets adultes* prélevées au cours de gastrectomie pour ulcère ou cancer de l'estomac, ou le plus souvent pour hypersplénisme. Trois de ces rates proviennent d'autopsies précoces de sujets décédés par métastases généralisées de cancer du sein.

3. — Ganglions.

Nos prélèvements sont beaucoup plus rares, nous n'avons examiné que 14 ganglions provenant en général de sujets atteints de dysglobulinémie (macroglobulinémie) ou de ganglions mésentériques pré-

levés au cours d'autopsies d'enfants. Des empreintes ont été faites immédiatement après le prélèvement comme pour les rates : le reste du prélèvement est congelé à — 70° et coupé au cryostat.

4. — **Thymus fœtal et foie fœtal.**

Pour chacun des fœtus dont nous avons prélevé la rate, nous avons également pris le thymus et le foie et fait à partir de ces organes des empreintes, des frottis et des coupes à congélation.

II. — Immunsérums utilisés. Préparation.

Tous les antisérums à l'exception d'un seul, ont été préparés chez des lapins, géants des Flandres, de 4 kg environ.

Chaque animal a reçu dans la pelote plantaire une injection intradermique de 3 à 5 mg de protéine, en émulsion dans des substances adjuvantes de Freund : un volume de solution de protéines pour un volume de substances adjuvantes (DIFCO).

Quinze jours après, trois injections de rappel sont faites, la première sous-cutanée de 3 à 4 mg de protéines adsorbées sur alun d'ammonium, la 2e et la 3e, intraveineuse les 2 jours suivants. Le mélange alun-protéine est préparé pour les 3 injections et il est fait dans la proportion de 5 ml d'une solution d'alun à 1 % pour 100 mg de protéine et neutralisé à la soude.

Lorsque les proportions de protéines ou les techniques diffèreront, elles seront précisées pour chacun des antisérums préparés.

En principe cette série d'injection de rappel est suffisante pour obtenir de bons anticorps ; ce que l'on vérifie par une saignée d'essai 6 jours après la dernière injection intra-veineuse. La réponse immunologique est contrôlée par ring test et par immunoélectrophorèse [54]. Si le taux des anticorps est suffisant, les animaux sont saignés à blanc et le sérum est réparti en ampoule et conservé congelé. Dans le cas contraire, une nouvelle série d'injections de rappel (une sous-cutanée, une intraveineuse) est faite aux mêmes doses de protéines.

1. — **Immunsérum anti Immunoglobulines G.**

Ils ont été obtenus par injections de IgG globulines humaines provenant du Centre National de Transfusion Sanguine, purifiées par chromatographie sur di-éthyl-amino-éthyl (D.E.A.E.) cellulose [68].

Ce sont les immunsérums n° 275 et 450.

Dans certains cas, les IgG globulines ont été légèrement dégradées par la trypsine (1 mg de trypsine DIFCO pour 5 mg d'IgG globulines en solution à pH 8, 24 h. à 37°) de façon à éliminer les impuretés et à obtenir de meilleurs antisérums (Immunsérum n° 280). Pour l'immunsérum n° 145 les IgG globulines ont été dégradées par la trypsine Worthington, 0,5 mg de trypsine pour 5 mg de IgG globulines.

Chaque antisérum est contrôlé par ring test avec les IgG globulines (solution à 50 µg/ml) et avec les protéines de Bence-Jones I et II (solution à 25 µg/ml).

Les antisérums ainsi obtenus ont des anticorps dirigés aussi bien contre la partie spécifique des IgG globulines (chaînes lourdes H.) que contre la partie commune aux trois immunoglobulines. Ils sont rendus spécifiquement anti IgG globulines par absorption par une petite quantité de lait humain, pauvre en IgG globulines, mais riche en IgA globuline ce qui va donc supprimer les anticorps dirigés contre la partie commune.

2. — **Immunsérum anti Immunoglobuline A.**

a) L'IgA globuline est plus difficile à obtenir à l'état pur à partir du sérum humain. Nous l'avons extrait en utilisant la technique d'Heremans [59] appliquée par Blanc [14] au lait maternel particulièrement riche en cette immunoglobuline.

Le lait humain est centrifugé à 6000 tours/mn pendant 60 minutes, puis filtré sur gaze et coton de façon à éliminer les lipides. Le lactosérum ainsi obtenu est précipité avec du sulfate d'ammonium à 35 % de saturation puis 40 % ; les deux précipités après lavage sont repris dans l'eau distillée et dialysés jusqu'à élimination totale de $SO_4(NH_4)_2$.

Le dialysat est alors mélangé à une quantité égale de ClNa 0,3 M. A ce mélange on ajoute de l'acétate de zinc molaire par petites quantités tout en maintenant le pH de la solution entre 6,3 et 8,5 avec du CO_3Na_2(M). Le tout est maintenu à la chambre froide pendant une heure, puis à 27° pendant 3 heures avec une agitation constante, et centrifugé ; le surnageant est dialysé contre l'eau distillée jusqu'à élimination totale de l'acétate de zinc (vérification par NaOH). La poudre obtenue après lyophilisation renferme environ 30 % de protéine et comme protéine sérique, presque exclusivement la β_2A globuline ; c'est elle qui va servir à l'immunisation des lapins. L'immunsérum obtenu est épuisé par du sérum de cordon (1 volume pour 10 volumes d'immunsérum). On sait en effet que le sérum de cordon contient les différentes protéines sériques à l'exception des immunoglobulines A et M qui, si elles existent ne le sont qu'en très faible proportion.

b) Un autre immunsérum de lapin (n° 330) a été préparé à partir de suc gastrique. Ce liquide renferme en effet un certain nombre de protéines sériques et fait particulier, il est très riche en immunoglobuline A et pauvre en immunoglobulines G.

Le suc gastrique est recueilli chez des sujets exempts de toute affection gastrique par tubage, à jeun, 1 heure après une injection sous-cutanée de 0,75 mg d'histamine, le liquide est concentré et dialysé contre le polyvinylpyrrolidone (P.V.P.) à 30 % pendant 10 à 18 heures à 4°, puis lyophilisé (Hirsch-Marie Burtin [60]). La poudre ainsi obtenue sert à l'immunisation des animaux, en suivant le protocole usuel décrit plus haut (chaque animal a reçu 0,5 cm³ d'un mélange de 2 cm³ de liquide gastrique concentré (20 à 40 mg/ml) mélangé à 1,5 cm³ de substances adjuvantes de Freund). L'immunsérum qui en résulte n'est évidemment pas pur. Il est rendu spécifiquement anti IgA globuline par absorption avec du sérum de cordon (1 volume pour 10 cm³ d'immunsérum). On fait ainsi disparaître les anticorps dirigés contre les protéines sériques autres que l'IgA globuline et éga-

lement les anticorps dirigés contre la partie commune IgG, IgA, IgM globulines. L'immunsérum ainsi obtenu est spécifiquement anti-chaines lourdes IgA globuline.

c) Nous avons également utilisé un sérum de cheval antisérum humain normal n° 1299 de l'Institut Pasteur, rendu spécifique contre la β_2A globuline par absorption avec le sérum d'un sujet abetaglobulinémique et n'ayant aucun autre déficit protéique.

3. — Immunsérum de lapin anti immunoglobuline M.

Les lapins ont été immunisés avec des macroglobulines pathologiques extraites de sérums de macroglobulinémies par précipitation soit par le froid dans les cas de cryoglobuline, soit par l'eau distillée, soit enfin par le $SO_4(NH_4)_2$ et purifiée par chromatographie sur Séphadex G 200. Le plus souvent deux de ces techniques ont été associées.

L'immunsérum n° 118 a été préparé à partir d'un sérum pathologique très riche en cryoglobuline. Après centrifugation à froid, la cryoglobuline est isolée et le surnageant dialysé contre l'eau distillée à froid. Le précipité d'euglobuline obtenu est redissout de même que la cryoglobuline avec du sérum physiologique. Deux précipitations dans 50 volumes d'eau distillée en présence de Cl_2Ca qui favorise la précipitation accroît la purification de cette macroglobuline qui est contrôlée par double diffusion en milieu gélifié (technique d'Oudin [88] modifiée par Ouchterlony [87]) avec un sérum anti IgG globulines et anti IgM globuline connu. Le mélange cryoglobuline et euglobuline sert à l'immunisation des lapins qui reçoivent 5 mg de protéines mélangées aux substances adjuvantes de Freund.

Pour la préparation des antisérums n° 041 et 402 l'IgM globuline a été extraite de sérums de sujets atteints de cirrhose présentant une augmentation importante de l'IgM globuline, la fraction globulinique est précipitée par le $SO_4(NH_4)_2$ à 38 % de saturation. Après 2 lavages le précipité est redissout dans l'eau physiologique et dialysé contre l'eau distillée. Le précipité euglobulinique obtenu est passé sur une colonne de Séphadex G 200 en tampon phosphate monosodique-disodique pH 7,5, 0,25 M. L'IgM globuline est recueillie dans les premiers tubes. Après lecture au spectrophotomètre à 280 mμ et contrôle en boîte d'Ouchterlony avec des sérums anti IgG globulines, anti IgM globuline, et anti α_2 macroglobuline. On groupe les tubes les plus riches en protéines et en même temps les plus purs en IgM globuline. Une dialyse contre l'eau distillée permet d'isoler un précipité de macroglobuline concentrée qui est remis en solution dans le sérum physiologique à une concentration finale de 24 mg/ml.

Pour l'immunisation chaque lapin reçoit 17 mg de protéines mélangées aux substances adjuvantes de Freund pour la première injection et 24 mg pour chacune des injections de rappel.

Pour ne plus contenir que des anticorps spécifiques anti IgM globuline les antisérums obtenus ont été épuisés soigneusement par des absorptions avec du sérum de cordon de façon à éliminer les traces d'anticorps réagissant avec les autres constituants du sérum humain.

4. — **Immunsérums anti chaînes légères.**

Rappelons d'abord que les protéines de Bence-Jones excrétées dans l'urine des sujets atteints de myélome sont de petites molécules portant une partie des déterminants antigéniques communs aux trois immunoglobulines. Les récentes études de Edelman et coll. [36] ont montré qu'elles étaient formées uniquement de chaînes légères. Les protéines de Bence-Jones appartiennent à 2 types sérologiques distincts I et II (Korngold [62], Burtin [18, 19, 20, 21], Scheidegger [97]) suivant les déterminants antigéniques IgG qu'elles portent : elles donnent des réactions de non identité entre elle et d'identité partielle avec les IgG globulines. On sait en effet, qu'il existe une hétérogénéité antigénique des IgG globulines portant sur les chaînes légères (Fahey [41, 42, 43], Mannik et Kunkel [73, 74]. Schématiquement une chaîne légère peut porter le déterminant antigénique des protéines de Bence-Jones du groupe I ou du groupe II mais non les deux à la fois. Partant de protéine de Bence-Jones de type I ou de type II, il sera aisé ainsi d'obtenir des anticorps dirigés respectivement contre les chaînes légères type I ou II. C'est ce que nous avons fait en immunisant des lapins avec des protéines de Bence-Jones extraites de l'urine de sujets myélomateux.

Après filtration les protéines urinaires sont précipitées au sulfate d'ammonium à 40 % puis 50 % de saturation. Le précipité obtenu est dialysé contre l'eau distillée de façon à éliminer toute trace de $SO_4(NH_4)_2$.

La concentration en protéine est déterminée par la technique du Biuret [63] et le groupe auquel appartient cette protéine est précisé en boite d'Ouchterlony en la faisant diffuser en gélose en même temps qu'une protéine de Bence-Jones de chacun des deux groupes contre un immunsérum anti IgG globulines (n° 281) qui contient des anticorps contre les protéines de Bence-Jones des groupes I et II.

L'immunisation des lapins est faite selon la technique usuelle ; chaque animal a reçu 10 mg de protéine mélangée à des substances adjuvantes de Freund en injection intra-dermique et 3 mg à 5 mg adsorbées sur alun par injection de rappel.

Après saignée, les sérums sont contrôlés par ring test avec une solution de protéine de Bence-Jones I et II et par immunoélectrophorèse contre les IgG globulines normales et contre les IgG globulines dégradées par la trypsine, de façon à contrôler la présence éventuelle d'autres déterminants appartenant aux IgG globulines.

On a ainsi obtenu trois types d'antisérums différents :

a) Les sérums n° 173 et 175 qui contiennent des anticorps dirigés contre les déterminants antigéniques des deux groupes de chaînes légères. Mis en présence de IgG globulines après migration électrophorétique, ils montrent 2 lignes parallèles avec les IgG globulines normales et, deux lignes lentes L_1 et L_2 et un déterminant moyen avec les IgG globulines dégradées par la trypsine. Ces antisérums ayant des anticorps contre les deux types de chaînes légères vont servir à révéler la structure commune aux trois immunoglobulines.

b) Le sérum n° 172 donne une réaction de précipitation nettement positive avec les protéines de Bence-Jones du groupe I, rien avec les protéines du groupe II. Il révèlera la chaîne légère du type I.

c) Le sérum n° 176 au contraire ne réagit qu'avec les protéines de Bence-Jones du groupe II, il révèle la chaîne légère type II.

Dans un certain nombre d'expériences nous avons utilisé les sérums n° 172 et 176 purifiés par passage sur paraaminobenzoylcellulose. Cette méthode permet d'obtenir des anticorps monospécifiques purs. L'antigène, protéine de Bence-Jones de type I ou II est fixé sur les groupements aminés de la cellulose grâce à une diazotation préalable, il accroche les anticorps qui lui sont spécifiques, et uniquement eux, lorsque l'on fait passer l'antisérum sur la colonne. Le complexe ainsi formé est ensuite dissocié par un brusque abaissement du pH qui libère l'anticorps purifié, celui-ci pourra être marqué directement.

d) Un des antisérums préparé avec un mélange de protéines de Bence-Jones du groupe II contaminé par des immunoglobulines G urinaires normales a permis de révéler l'existence d'un troisième type de chaîne légère (Burtin [22]) qui existe en proportion très faible dans les IgG globulines. Après absorption cet antisérum n° 198 a été utilisé comme anti-chaîne légère type III spécifique.

III. — Marquage des immunsérums.

Pour le marquage nous ne prenons que la fraction globulinique « anticorps » des immunsérums de lapin. Cette fraction est isolée par précipitation au sulfate d'ammonium à 40 % de saturation. Après lavage le précipité est dissout et dialysé contre une solution physiologique de ClNa à 9 ‰.

La solution de globuline obtenue est utilisée à une concentration de 1 à 2 % tamponnée à pH 8,9 avec un tampon carbonate-bicarbonate de sodium (bicarbonate de sodium 4 g, carbonate de sodium 0,7 g, eau qsp 100). Le marquage est fait avec deux fluorochromes différents: la fluorescéine et la rhodamine.

1. — L'isothiocyanate de fluorescéine cristallisé (Prolabo) est utilisé selon Goldstein et Coll. [52] à la dose de 1,5 mg pour 100 mg de protéine. La poudre est mise au contact de la solution de globulines tamponnées et laissée sous agitation magnétique lente à 4° pendant 10 à 15 heures.

2. — La Lissamine-Rhodamine adsorbée par la Célite [93, 94] est utilisée dans les mêmes conditions, mais à la dose de 30 mg pour 100 mg de globulines, dix minutes de contact en agitant doucement suffisent.

3. — L'utilisation de la sulforhodamine nécessite une chloruration faite selon la technique décrite par Uehlecke [110]. La poudre de sulforhodamine 6 à 10 mg pour 100 mg de protéine est broyée en présence d'une quantité double de pentachlorure de phosphore anhydre, d'abord à sec, puis sous une petite quantité d'acétone. C'est ce mélange, après centrifugation, qui est mis au contact de la solution de globulines tamponnée. Après 10 à 12 heures de contact, la

préparation est à nouveau centrifugée. Quel que soit le procéde utilisé, le colorant non fixé est éliminé par filtration sur Séphadex. On utilise pour cela 20 g de Séphadex G 25 Médium en tampon phosphate 0,01 M pH 7,5, dans une colonne de 2 cm de diamètre et 25 à 30 cm de hauteur. La solution d'anticorps est déposée au sommet de la colonne, et la filtration permet de recueillir les anticorps marqués alors que le colorant libre est retenu par le Séphadex.

Dans certains cas, en particulier avec la Rhodamine Célite et l'Isothiocyanate de Fluorescéine, on peut déjà déterminer le taux de marquage et utiliser la solution d'anticorps fluorescents plus ou moins diluée. Dans le cas de sulforhodamine, il est préférable de chromatographier sur cellulose D.E.A.E. les anticorps marqués obtenus après filtration sur Séphadex. Cette chromatographie permet de sélectionner les anticorps en fonction de leur taux de marquage et retient les globulines trop fortement chargées négativement susceptible de se fixer de façon non spécifique sur les préparations microscopiques. Pour la chromatographie sur cellulose D.E.A.E. nous avons appliqué la technique décrite par Goldstein [52] et légèrement modifié (Burtin, Buffe [23]), la cellulose est tassée en présence de tampon phosphate monopotassique-bipotassique pH 7,5 - 0,01 M dans une colonne de 30 cm de haut et 2 cm de diamètre.

Pour éluer les protéines, un gradient de type convexe est établi en mélangeant progressivement le tampon de base monopotassique-bipotassique au même tampon auquel a été ajouté du ClNa 0,5 M. Pour chaque tube de 10 cm^3 de solution on mesure au spectrophotomètre l'absorption dans le visible à 495 mμ pour la fluorescéine et à 580 mμ pour la Rhodamine, on détermine ainsi la quantité de fluorochrome ; une deuxième lecture est faite en ultra-violet à 280 mμ pour déterminer la quantité de protéine comparativement à une courbe d'étalonnage d'IgG globulines ; mais les chiffres obtenus en U.V. doivent être corrigés en fonction de l'absorption assez forte des fluorochromes en lumière ultra-violette. Le coefficient de correction a été établi à l'aide d'une solution de sulforhodamine ou d'isothiocyanate de fluorescéine en tampon carbonate-bicarbonate pour les concentrations de 1 à 10 mg de fluorochrome par millilitre.

L'absorption en ultra-violet de la fluorescéine est égale à 4/10 de l'absorption dans le visible à 495 mμ. Pour la rhodamine l'absorption en ultra-violet est égale aux 45/100 du chiffre indiqué dans le visible à 580 mμ. Ces valeurs doivent donc être retranchées du chiffre obtenu à 280 mμ pour avoir le taux réel de protéine.

Ainsi peut-on déterminer dans chaque cas, qu'il y ait eu ou non, chromatographie sur D.E.A.E. cellulose le taux de marquage c'est-à-dire le rapport fluorochrome/protéine qui doit être compris entre 2 et 5×10^{-3} ; des taux de 10×10^{-3} ont pu être utilisés pour la sulforhodamine sans inconvénient. L'antisérum marqué est conservé, congelé, réparti en ampoule de 1 cm^3 environ à la concentration de 5 à 10 mg de protéine par ml. De chaque antisérum, deux lots ont été faits, l'un marqué à la Rhodamine, l'autre à la fluorescéine de façon à permettre différentes associations de double marquage.

IV. — Marquage des préparations microscopiques.

1. — Fixation.

Les frottis et les coupes sont fixés avant tout marquage par les anticorps fluorescents. Pour cela nous avons étudié comparativement différents fixateurs utilisés couramment en cytologie : acétone, alcool éthylique à 95°, alcool-éther (10 %), alcool-acide (5 %), méthanol, Carnoy, acroléine-formol (5 %) et glutaraldéhyde.

Pour les 5 premiers le temps de fixation était de 5 à 10 minutes pour les frottis et empreintes, 20 mn pour les coupes. La durée de fixation est beaucoup plus réduite avec le « Carnoy » 30 secondes pour les frottis, 5 minutes au maximum pour les coupes, mais les résultats sont moins constants. Enfin pour l'acroléine-formol et le glutaraldéhyde nous avons respecté les normes des microscopistes électroniciens, utilisateurs habituels de ces fixateurs :

— soit 10 à 15 minutes pour l'acroléine-formol

— et 15 minutes pour le glutaraldéhyde

suivis de 3 lavages abondants au tampon phosphate pH 7,4.

Tous ces fixateurs peuvent être utilisés indifféremment ils donnent des résultats identiques avec quelques réserves pour l'acétone et l'acroléine-formol qui nous ont paru exalter la fluorescence spontanée verte des tissus.

Aussi pour des raisons de simplifications techniques avons nous adopté l'alcool éthylique ou méthylique pendant 5 minutes sur les frottis et empreintes et 20 minutes sur les coupes.

2. — Marquage proprement dit.

Après fixation et rinçage à l'eau distillée pour éliminer toute trace de fixateur, les préparations sont rincées avec une solution physiologique tamponnée à pH 7,4 et recouvertes de quelques gouttes d'immunsérums fluorescents pendant 20 à 40 minutes en chambre humide à 37°. Deux lavages en sérum physiologique de 5 minutes chaque et un rinçage à l'eau distillée éliminent les anticorps non fixés. Après séchage à l'air la lame est prête à l'observation. Le plus souvent, après une première observation la préparation est soumise à un deuxième marquage avec un deuxième antisérum de spécificité et de fluorescence différente, selon la même technique.

V. — Etude microscopique en fluorescence.

Elle a été faite avec un microscope Leitz équipé d'un condenseur fond noir et d'un condenseur universel à contraste de phase. La source d'U.V. est fournie par une lampe à vapeur de mercure Osram HBO 200 devant laquelle sont placés : un filtre anticalorique, un filtre d'excitation UG1 (2 mm) et 1 filtre de transmission bleu BG12.

Les préparations ont été observées à sec sans montage particulier, mais le contact lame-condenseur fond noir était établi par une goutte

d'huile à immersion non fluorescente (huile à immersion Leitz nD = 1,515). Pour les forts grossissements × 90 × 100 (objectifs à immersion) l'huile a été mise directement sur la préparation sans lamelle intermédiaire. L'observation et les photos sont faites à travers un filtre intermédiaire absorbant les radiations bleues.

Nous avons eu recours à des filtres sélectifs Wratten 23A et 57A comme l'ont indiqué Bernier et Cebra [8] pour analyser les images de fluorescence mixte. Les photographies ont été prises avec un film lumière du jour super Anscochrome 100 ASA développé en 200 ASA.

Les temps de pose ont varié de 2 à 10 minutes soit par réglage manuel empirique soit par réglage automatique avec la caméra automatique Leitz.

VI. — Contrôle de la spécificité de la fluorescence.

Chaque préparation est observée sans aucun marquage pour contrôler la fluorescence spontanée. Il s'agit en règle de fluorescence verte due surtout aux fibres conjonctives ou élastiques des tissus, ou à la graisse, il peut s'agir de fluorescence orangée due à des pigments : cette dernière étant beaucoup plus rare, dans la plupart de ces cas, un contrôle en contraste de phase permet de préciser la localisation extra-cellulaire de ces fluorescences.

Plus gênante est la fluorescence jaune verte parfois intense, intra cytoplasmique, de certaines cellules, en règle de cellules jeunes que l'on observe dans les frottis de moelle ou les coupes de rate. Si ce type de fluorescence élimine tout marquage par la fluorescéine il ne permet pas plus le marquage par la Rhodamine. On a constaté en effet que ces cellules spontanément fluorescentes fixaient intensément tous les fluorochromes. Ces préparations doivent donc être éliminées dès le départ.

La spécificité du marquage est contrôlé en déposant sur la lame un antisérum fluorescent préalablement absorbé par l'antigène correspondant et dont l'épuisement a été vérifié. Cet antisérum ne doit faire apparaître aucune cellule fluorescente. Ce contrôle négatif prend toute sa valeur (on sait les variations cellulaires qualitatives et quantitatives d'un frottis à l'autre) lorsque la même lame marquée avec le même antisérum, non épuisé cette fois, montre des images fluorescentes.

VII. — Contrôle du type cellulaire.

— Au cours de l'observation, la localisation intracellulaire de la fluorescence est vérifiée grâce au condenseur à contraste de phase, chaque fois que les préparations le permettent, c'est-à-dire, pour les empreintes et les frottis et dans les endroits particulièrement minces des coupes.

— Un essai d'identification des cellules en cause basé sur les propriétés tinctoriales est fait par coloration des préparations au May-Grünwald-Giemsa, après repérage des cellules grâce aux verniers du microscope. Mais cette coloration a souvent donné des résultats

médiocres même après une fixation intermédiaire. Elle permet de préciser les rapports du noyau et du cytoplasme, mais difficilement de juger de la structure du noyau et surtout de la coloration du cytoplasme dont les propriétés tinctoriales sont souvent modifiées par la fixation des anticorps fluorescents.

Nous avons quelquefois employé l'acridine orange en solution à 1/10 000 pour colorer le noyau des cellules marquées selon une technique étudiée par B. Sordat [103]. Cette méthode permet de préciser mieux que toute autres, les limites exactes du cytoplasme et du noyau et renseigne parfois sur la structure de ce dernier.

RÉSULTATS

I. — L'origine cellulaire des trois immunoglobulines.

Nous avons recherché les différentes immunoglobulines principalement sur des frottis de moelle provenant de sujets atteints de myélome et sur des coupes de ganglion de macroglobulinémie de Waldenström, la richesse en plasmocytes et en cellules lymphoplasmocytaires nous permettant d'espérer trouver plus facilement côte à côte des cellules à potentialité différente. Toutes nos observations ont été ensuite confirmées sur des frottis de moelle, des empreintes et des coupes de rates et de ganglions provenant de sujets normaux ou atteints d'autres affections.

La plupart des frottis et coupes ont été soumis à deux marquages différents, quelquefois trois quand un était resté totalement négatif. Nous avons ainsi révélé les cellules à IgG globulines avec les immunsérums 275 SR (marqué à la Rhodamine), IF (marqué à la fluorescéine) 450 IF, 145 SR ou IF ; les cellules à IgA globuline avec les antisérums 1299 SR, 446 SR, 043 IF, 330 IF, les cellules à IgM globuline avec les antisérums 041 IF, 402 IF, 118 SR ou IF.

Pour chaque cas, un minimum de 10 lames a été étudié de façon à réaliser les différentes associations :

anti IgG — anti IgA
anti IgG — anti IgM
anti IgA — anti IgM

et inversement ; chaque immunoglobuline était révélée par deux sérums l'un marqué à la rhodamine l'autre à la fluorescéine de façon à éviter tout risque de fixation préférentielle.

1. Nous avons trouvé chacune des trois immunoglobulines dans des cellules de morphologie identique, que ce soit sur des frottis de moelle, des empreintes ou des coupes de ganglion ou de rate. Ces cellules sont, le plus souvent, des plasmocytes, soit typiques avec leur noyau excentré et relativement petit, soit surtout des cellules plus jeunes, avec un gros noyau central ou légèrement excentré et une couronne de cytoplasme importante, proplasmocytes ou plasmoblastes. Quelquefois même la couronne de cytoplasme est réduite à un mince anneau entourant un noyau régulier, rond. Il est difficile d'éliminer la nature lymphocytaire de telles cellules (fig. 1, 2, 3, 4).

Nous avons également observé, en particulier sur des frottis de moelle de myelome, mais, également sur des moelles de jeunes enfants, de grandes cellules très étalées, aux contours cytoplasmiques irréguliers, au protoplasme granuleux parfois vacuolisé, au noyau rond plus ou moins excentré ; ces cellules appartiennent vraisemblablement à la série réticulaire : ce pourrait être les cellules de transition décrites par Fagraeus [40] et observées par Ortéga et Mellors [86] et Mellors et Korngold [75] (fig. 5).

Dans les ganglions de macroglobulinémie, la plupart des cellules fluorescentes sont rondes avec un gros noyau central et une étroite couronne de cytoplasme. Ces cellules appartiennent vraisemblablement à la série lymphocytaire [66] (fig. 3).

Fait important, dans presque toutes ces cellules la fluorescence a une disposition granuleuse bien visible aux forts grossissements. Les granulations généralement régulières sont réparties dans tout le cytoplasme. On peut observer aussi assez souvent des granulations sur le noyau. S'agit-il d'une superposition de grains cytoplasmiques se projetant sur le noyau ou de granulations réellement intranucléaires, il est difficile de l'affirmer. Cependant certaines de ces granulations plus grosses que celles observées au niveau du cytoplasme semblent bien être intranucléaire, elles paraissent correspondre aux nucléoles comme semblent l'indiquer des recolorations par le May-Grünwald-Giemsa, ou par l'acridine orange. Parfois les granulations sont très fines, donnant un aspect presque homogène du cytoplasme dont la fluorescence dans ce cas est en général moins intense. Ces cellules peuvent se rencontrer à côté de cellules très granuleuses sur un même frottis ou être le type dominant dans quelques cas exceptionnels, il est vrai.

Ce double aspect de la fluorescence sur une même lame nous permet d'éliminer l'hypothèse d'un artefact dû au fixateur utilisé : nous avons obtenu des images granuleuses aussi bien avec l'alcool acide, l'alcool-éther, l'acétone, l'acroléine-formol, le glutaraldéhyde qu'avec l'alcool méthylique pur, et même par marquage direct sans fixation préalable des coupes à congélation et des frottis ou des empreintes séchés à l'air.

Il nous a semblé que l'aspect homogène se rencontrait plus fréquemment dans des grandes cellules à gros noyau central et à couronne cytoplasmique régulière, plus ou moins large, cellule évoquant le lymphoblaste, alors que les grosses granulations se trouvent dans les cellules type réticulaire ou dans les plasmocytes plus ou moins typiques.

Ces granulations sont toujours bien visibles au contraste de phase, mais pas après recoloration au May-Grünwald-Giemsa ce qui n'est pas pour étonner au moins en ce qui concerne les plasmocytes dont le cytoplasme est agranuleux sur les frottis colorés, mais qui semble chargé de granulations irrégulières abondantes maxima autour de l'archoplasme à l'observation en phase (in « Maladies du Sang », J. Bernard [7]. Il est possible que ces granulations correspondent aux vésicules ergastoplasmiques révélant l'activité sécrétoire : l'intensité de la fluorescence étant souvent d'autant plus grande que la cellule est plus granuleuse comme nous l'avons déjà signalé plus haut.

2. Un autre argument nous paraît en faveur de ce rapport avec des grains de sécrétions : l'action de la ribonucléase. L'aspect granuleux se modifie en même temps que la fluorescence sous l'action de l'enzyme.

MOELLE.

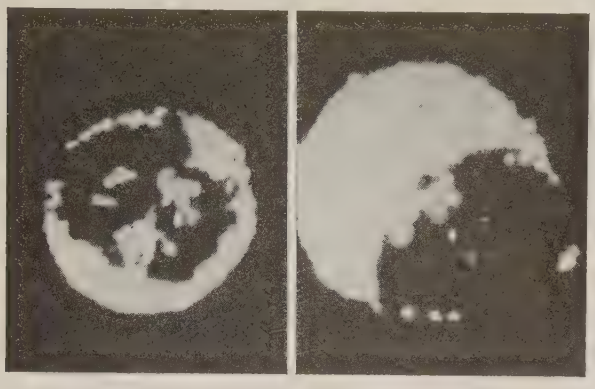

FIG. 1. — Différents types cellulaires observés sur un frottis de moelle provenant d'un sujet adulte. Noter les granulations nucléaires.

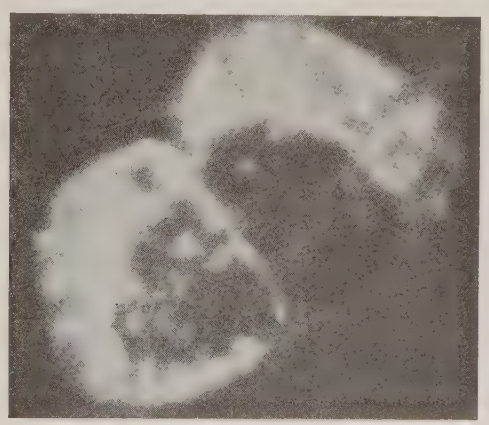

FIG. 2. — Plamocytes provenant d'un prélèvement de moelle d'un jeune enfant.

Les préparations non fixées ont été immergées dans une solution de ribonucléase à 200 µg par ml en solution physiologique tamponnée pH 7,4 pendant des temps variables de 5 minutes à 60 minutes à la température de 37°, puis lavées dans plusieurs bains de tampon dilué

au 1/2 avec de l'alcool de façon à fixer en même temps les préparations. Un dernier bain dans l'alcool pur complète la fixation. Les préparations sont ensuite marquées selon la même technique que les préparations non soumises à l'action de l'enzyme. Il y a peu de diffé-

RATE.

Fig. 3. — Cellule à Ig M globuline.

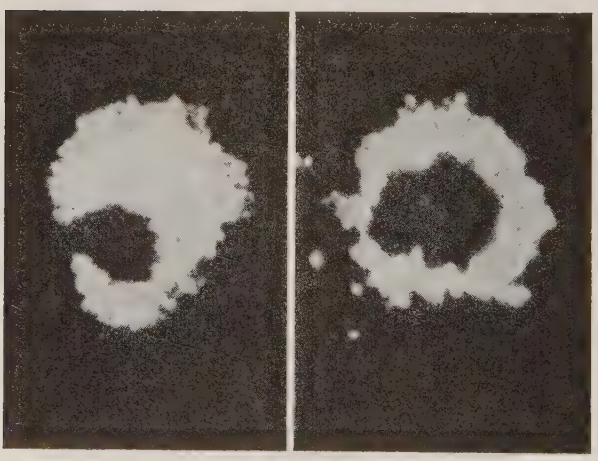

Fig. 4. — Deux cellules de morphologies différentes marquées avec un anti sérum anti Ig A

rence jusqu'à 10 minutes de contact. A partir d'un quart d'heure, on note une atténuation de la plupart des granulations, la fluorescence est très intense mais plus diffuse. Au bout de 30 à 45 minutes, on constate une disparition quasi complète des grains cytoplasmiques.

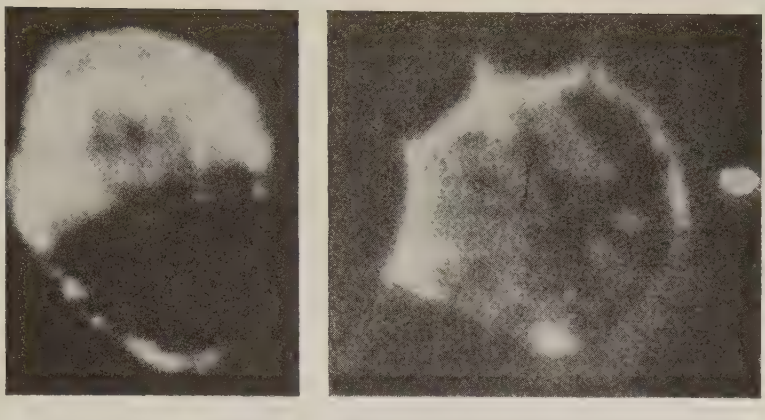

Fig. 5.

A gauche : Chaînes légères de type X (sérum n° 176 SR). Ponction sternale d'un sujet hypergammaglobulinémique sans dysprotéinémie.

A droite : Chaînes légères de type K (sérum n° 172 IR). Ponction sternale de γ myélome.

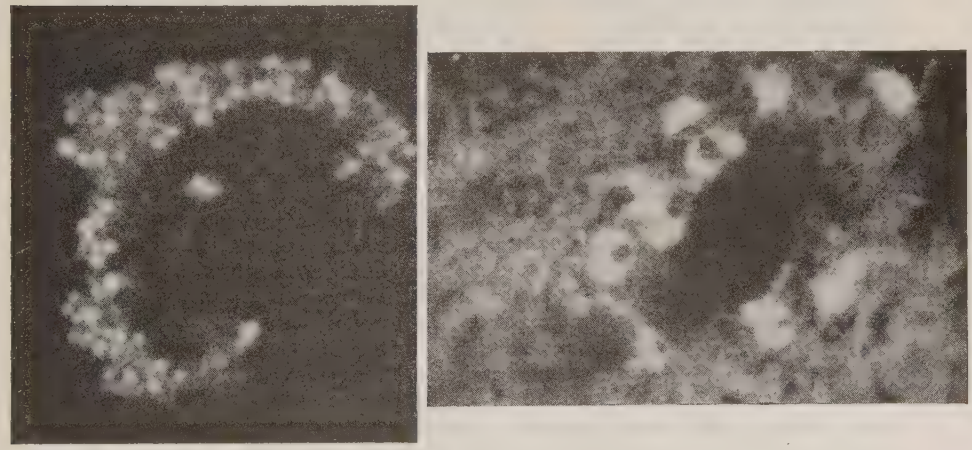

Fig. 6.

A gauche : Ponction sternale de jeune enfant : chaîne légère (sérum 175 SR) chaîne lourde (sérum 145 IF), granulations de couleurs différentes juxtaposées dans la même cellule.

A droite : Coupe de rate adulte. Plasmocytes marqués avec un sérum anti Ig G (145 IF).

Le cytoplasme reste intensément fluorescent, mais de façon diffuse. Après une heure de contact les cellules fluorescentes ont un aspect très particulier, il n'y a pas de granulations cytoplasmiques, seule persiste une bordure cytoplasmique fluorescente périphérique alors que la zone périnucléaire n'est plus marquée. Par contre les grains intranucléaires, vraisemblablement nucléolaires persistent.

3. Lorsque nous utilisons deux anticorps à spécificité et fluorescence différentes sur la même préparation, on trouve dans la très grande majorité des cas une seule immunoglobuline par cellule. Certaines cellules contiennent de l'immunoglobuline G, d'autres de l'immunoglobuline A ou de l'immunoglobuline M. Ces cellules à fonction différente peuvent être proches les unes des autres ; c'est ainsi que nous avons pu observer sur le même frottis, voire dans le même champs, des plasmocytes de couleurs différentes, donc contenant chacun une immunoglobuline différente. Le plus souvent, et ceci est particulièrement net sur les coupes de rate ou de ganglion, ces cellules sont situées dans des zones relativement spécialisées. Il n'est pas rare de trouver une zone où existent essentiellement des cellules à immunoglobulines G et quelques coupes plus loin une autre zone caractérisée par des cellules à immunoglobuline M. La disposition topographique des cellules à immunoglobuline A est moins nette. Ces cellules, en règle moins nombreuses à quelques exceptions pathologiques près, sont plus isolées. On en trouve quelques unes au milieu de groupes de cellules à IgG globulines, particulièrement dans les régions périvasculaires (fig. 6), sur les coupes où la spécialisation est moins évidente, où l'on peut observer des follicules renfermant les trois types d'immunoglobulines. Dans ces cas, les cellules à immunoglobuline M sont plus périphériques, en bordure des sinus, dans les cordons de Billrôth, elles sont plus isolées aussi par petits groupes de 2 ou 3 cellules.

Nous avons trouvé quelques rares cellules contenant deux immunoglobulines : immunoglobuline G et immunoglobuline M ou immunoglobuline A et immunoglobuline M. Bien entendu, l'utilisation de deux fluorochromes différents ne nous permet pas de savoir si une seule cellule peut contenir les trois immunoglobulines à la fois.

4. Dans tous les cas, seule une partie des plasmocytes a fixé les anticorps fluorescents. En effet, sur 65 moelles étudiées, après en avoir éliminées 11 pour fluorescence spontanée et fixation non spécifique des anticorps, 28 sont demeurées totalement négatives, soit un peu plus de la moitié. Le pourcentage des résultats totalement négatif est plus faible dans la rate : 9 n'ont rien révélé sur les 46 rates retenues. Nous avons dû en éliminer 7 pour fluorescence spontanée et fixation non spécifique des anticorps marqués ; deux provenaient de sujets adultes l'une avait été prélevée par autopsie chez une femme décédée de métastases généralisées d'un cancer du sein, l'autre avait été prélevée chirurgicalement pour hypersplénisme ; cinq étaient des rates d'enfants toutes prélevées par autopsie relativement précoce, entre 4 et 8 heures après la mort.

Les 9 résultats négatifs nous ont été fournis par les rates de jeunes fœtus dans cinq cas, nous en reparlerons plus loin ; 3 rates d'adultes,

une d'enfant. Pour ces 4 cas il est difficile d'affirmer qu'elles seraient restées négatives si la rate entière avait été coupée. Quoi qu'il en soit, il est rare que la majorité des cellules plasmocytaires soit fluorescente, même sur des frottis positifs.

C'est ainsi que nous avons déjà signalé (Burtin et Buffe [23, 24] une négativité de l'immunofluorescence plus fréquente dans les β_2A myélomes que dans les γ myélomes. En ce qui concerne les coupes de rate et de ganglions, le polymorphisme cellulaire rend plus difficile l'appréciation du nombre de cellules fluorescentes par rapport au nombre de plasmocytes il est cependant net que le premier est inférieur au second et ceci de manière variable.

Les petits plasmocytes mûrs fixent beaucoup moins les anticorps fluorescents que les cellules jeunes.

II. — Origine cellulaire des différentes chaînes polypeptidiques des immunoglobulines.

Nous avons recherché les différentes chaînes polypeptidiques constituant les immunoglobulines sur les frottis, empreintes ou coupes provenant de prélèvements identiques à ceux qui nous ont servi à étudier l'ensemble des immunoglobulines.

1. — Chaînes légères et chaînes lourdes.

Chacune des trois immunoglobulines est constituée de deux types de chaînes différenciées selon leur poids moléculaire en chaînes légères et chaînes lourdes que des déterminants antigéniques différents permettent d'identifier. Les chaînes légères sont communes aux trois immunoglobulines, les chaînes lourdes spécifiques à chacune.

Nous avons marqué chacune de nos préparations successivement par des anticorps anti chaînes légères : sérum 175 IF ou 173 SR et anti chaînes lourdes : sérum 145 pour la révélation de la structure spécifique des immunoglobulines G sérum 330 et 043 pour les immunoglobulines A et sérum 041 et 118 pour les immunoglobulines M.

Nous avons trouvé les chaînes légères et lourdes de l'immunoglobuline G dans les mêmes cellules. La fluorescence observée peut être de teinte intermédiaire elle affecte alors toutes les granulations ; l'emploi de filtres sélectifs verts et rouges sur l'oculaire nous permet d'analyser les deux composantes de cette fluorescence. On peut également observer la juxtaposition de grains rouges et verts dans le cytoplasme, (fig. 6) le nombre des grains d'une couleur pouvant varier d'un cas à l'autre et selon la localisation intra cytoplasmique. Le plus souvent dans ce cas, la fluorescence correspondant aux anticorps anti chaines légères est maxima dans la région périnucléaire alors que celle due aux anticorps anti chaînes lourdes prédomine à la périphérie, ou même n'occupe qu'une zone de cette périphérie. Mais il n'y a là rien d'absolu et l'on a pu observer une disposition inverse, en particulier dans des cas de myélome avec dysglobulinémie.

Les résultats sont les mêmes en ce qui concerne l'immunoglobuline A. Nous avons obtenu une fixation des anticorps anti chaîne légères

et anti chaînes lourdes dans les mêmes plasmocytes ; là encore nous avons observé des granulations de teinte mixte ou une juxtaposition de grains de couleurs différentes sans qu'il nous soit possible d'affirmer une prédominance sélective dans une région déterminée de la cellule.

En ce qui concerne l'immunoglobuline M, si nous avons trouvé des résultats identiques sur certaines empreintes de rate, il nous a été difficile d'obtenir une fixation des anticorps anti chaînes légères sur d'autres et dans la plupart des coupes de rate ou de ganglions de macroglobulinémie alors que l'anticorps spécifique anti immunoglobuline M donne les mêmes images granuleuses observées avec les anti immunoglobulines G et immunoglobuline A.

Si nous essayons de résumer comparativement sur 37 cas la répartition des chaînes légères et des chaînes lourdes dans une même cellule nous voyons :

— la grande majorité des cellules réagir apparemment plus avec l'anticorps anti chaînes légères dans 15 cas ;

— les deux anticorps se fixer à peu près également dans 9 cas ;

— la fluorescence due à l'anticorps anti chaînes lourdes être la plus importante dans 13 cas.

Ces résultats sont globalement à peu près les mêmes selon les organes (tableau n° 3). Ainsi nous ne pouvons pas conclure à une prédominance d'un type de chaînes par rapport à l'autre, d'autant moins que nous avons constaté parfois une discordance d'un organe à un autre, chez le même sujet :

— prédominance de chaînes légères dans la rate et prédominance de chaînes lourdes dans un ganglion dans un cas ;

— prédominance des chaînes légères dans la moelle et répartition à peu près équivalentes des deux chaînes dans la rate ou inversement c'est ce qu'indiquent les astérisques portés sur le tableau.

Tableau III.

	Nb.	L > H	L = H	L < H
Moelle	14	6*	3*	5
Rate	18	8*+	5*	5
Ganglion	5	1	1	3+
Total	37	15	9	13

Répartition chaînes légères chaînes lourdes selon les organes.

2. — Les différents types de chaînes légères.

Les antisérums dirigés spécifiquement et uniquement contre un type de chaînes légères nous ont permis de voir que les anticorps anti

chaînes I (K) et II (λ) se fixent en règle sur des cellules différentes mais de même morphologie. Ces cellules, peuvent être groupées en petits amas du même type, nous avons parfois observé quelques follicules formés d'un seul type de cellules, mais le plus souvent les cellules sont isolées et l'on observe côte à côte des cellules du type I et II dans les mêmes zones lymphoïdes.

Il est rare d'observer des cellules mixtes contenant les deux types de chaînes légères que ce soit sur les frottis de moelle, les empreintes, ou les coupes de ganglions ou de rate. Nous n'avons pas trouvé à ces cellules mixtes de localisation particulière dans les follicules lymphoïdes comme l'on décrit Chiappino et Pernis [27].

Le nombre respectif des cellules contenant les chaînes K ou λ varie d'une coupe à l'autre, d'une zone à l'autre et surtout d'un individu à l'autre.

Sur 30 cas examinés nous constatons que les chaînes du type I (K) prédominent 8 fois et les chaînes du type II (λ) 11 fois. Ces résultats sont résumés dans le tableau n° 4.

Tableau IV.

	Nb.	K > λ	K = λ	K < λ
Moelle	13	3 (dont 2**)	5	5
Rate	15	5	6	4 (dont 2**)
Ganglion	2	—	—	2
Total	30	8	11	11

Répartition des deux types de chaînes légères.

Lorsque nous avons pu examiner la rate et la moelle d'un même malade nous avons observé parfois la même dominante d'un type de chaîne légère dans les deux prélèvements mais nous avons également observé des résultats inverses avec prédominance des chaînes K dans la moelle et des chaînes λ dans la rate. Là encore il est difficile de conclure : la rate entière n'ayant pas été examinée. Certes des prélèvements sont faits à différents niveaux de l'organe et chaque prélèvement coupé en série mais il est difficile d'affirmer qu'un autre fragment aurait donné les mêmes résultats alors que nous observons des variations importantes d'une série de coupes à l'autre.

Sur les frottis de moelle osseuse provenant de sujets myélomateux nous n'avons parfois trouvé qu'un seul type de cellules K ou λ.

Des anticorps fluorescents contre le type III de chaînes légères (Burtin [22]) ont marqué quelques cellules dans des coupes de ganglions, de rate, et sur des frottis de moelle osseuse. Le nombre des cellules marquées est beaucoup plus restreint que celui des cellules type I ou II. Il est approximativement de 2 %.

III. — Localisation des immunoglobulines chez le fœtus et le jeune enfant.

On admet que le fœtus humain dans les conditions normales est protégé des stimuli antigéniques et ne fabriquent pas d'anticorps. Les immunoglobulines trouvées dans le sérum du fœtus ou du nouveau-né seraient d'origine maternelle, le passage transplacentaire se faisant sélectivement pour les γ G globulines. Mais dès la naissance, on observe un accroissement rapide en quelques jours du taux de γ M globuline. La synthèse de γ G et γ A globulines démarre plus tardivement au cours de la 3e, 4e semaine (West 1962 [113] Zak et Good 1959 [117]). Cependant dans des conditions pathologiques on a montré que le fœtus humain était capable de répondre à une infection par une multiplication plasmocytaire et la production d'anticorps (Silverstein et Lukes 1962 [99]). En appliquant les mêmes techniques de marquage avec les mêmes antisérums que pour l'étude précédente nous avons cherché dans ce travail à vérifier à partir de quel moment de la vie fœtale on voyait apparaître des cellules capables de produire des immunoglobulines et dans quels organes :

1. — Foie.

C'est l'organe principal de l'hématopoïèse du 2e au 7e mois de la vie fœtal. Il donne naissance d'abord aux éléments de la lignée rouge normoblastique et bien qu'il ne contienne pas d'amas lymphoïdes spécialisés, le nombre de cellules jeunes et leur aspect au May-Grünwald-Giemsa nous ont incité à y rechercher des cellules immunocompétentes.

Nos résultats ont toujours été négatifs quel que soit l'âge du fœtus et l'antisérum utilisé. Il est vrai que nous n'avons pas fait de coupes systématiques de cet organe dans tous les cas, mais étudié surtout des empreintes.

2. — Moelle osseuse.

La fonction sangui-formatrice de la moelle devient prépondérante à partir du 4e mois de la vie intra-utérine. Nous n'avons étudié que quelques frottis provenant de fœtus de 5 à 7 mois, là encore sans succès. Il faut noter que ces frottis étaient très pauvres en cellules.

3. — Thymus.

Le rôle attribué au thymus dans l'immunité néonatale et sa richesse en cellules lymphoïdes nous permettaient d'espérer quelques résultats positifs, mais en fait, nous n'avons observé que dans deux cas seulement sur 17 la présence de γ globulines intracellulaire et encore le nombre des cellules marquées était-il très restreint.

Il s'agissait d'assez grandes cellules à cytoplasme granuleux, à noyau médian ou parfois excentré comme celui des plasmocytes. Les colorations au May-Grünwald-Giemsa ne nous ont pas montré de plasmocytes typiques, mais des cellules jeunes à noyau clair, cellules lympho-monocytaires qu'il nous est difficile de rattacher à un type déterminé.

Si nous n'avons observé que de façon très exceptionnelle de marquage intra-cellulaire dans les cellules lymphoïdes du thymus quel que soit l'antisérum utilisé, nous avons noté par contre à partir du 5e mois de la vie fœtale une fixation des anticorps anti γ et β_2A en une mince couronne bordante homogène vraisemblablement extra cellulaire.

Dans un cas (il s'agissait d'un nouveau-né prématuré) les sérums anti γ ont marqué électivement quelques corpuscules de Hassal. Une observation analogue a été faite par Mellors et Korngold [75].

Dans le cas de ce prématuré nous avons observé également des petits foyers de cellules marquées par les anticorps anti IgG globulines et anti IgM globuline dont la morphologie rappelait le plasmocyte. Ces plasmocytes siégeaient surtout dans les trabécules interlobulaires, plus rarement isolés à l'intérieur des lobules. Les cellules à IgM globuline étaient plus nombreuses que les cellules à IgG globulines.

4. — Rate.

Vers le 4e mois de la vie fœtale, comme la moelle la rate commence à fonctionner pour remplacer complétement le foie vers le 8e mois. Ses fonctions sont essentiellement granuloblastiques et normoblastiques. Ses fonctions lymphoïtique s'installent progressivement pour devenir prédominantes dans la vie post fœtale.

Nous avons pu observer dès la 12e semaine la présence de quelques cellules contenant de l'IgM globuline. Ces cellules dont le nombre semble s'accroître au cours de la vie fœtale sont les seules cellules immunocompétentes observées jusque vers la vingtième, vingt-deuxième semaine. Leur nombre est proportionnellement plus élevé que celui observé chez l'adulte. A partir du 5e et 6e mois nous voyons apparaître des γ globulines intra-cellulaires mais toujours en proportion moindre que la β_2M globuline et toujours moins que sur une coupe de rate de sujet adulte.

Nous n'avons jamais observé de cellules renfermant de la β_2A globuline à une seule exception près, encore, le nombre de ces cellules marquées était-il très restreint ; et de plus ne contenaient-elles que quelques grains disséminés dans le cytoplasme, de faible intensité mais dont la couleur n'a pas varié dans les images mixtes obtenues après remarquage par l'anti chaîne légère.

Chez le jeune enfant, dans les quelques rares cas que nous avons pu retenir l'évolution est identique à celle du fœtus à terme : nombreuses cellules contenant γ et β_2M globuline, très rares cellules à β_2A globuline dans la rate.

DISCUSSION

1. Nos observations rejoignent celles de différents auteurs et notamment Mellors et Korngold [75], Solomon [102], van Furth [50], qui ont montré la localisation des trois immunoglobulines dans les cellules lymphoïdes. Les cellules contenant les immunoglobulines sont le plus souvent des plasmocytes, mais comment classer les cellules rondes à

gros noyau plus ou moins central, à couronne de cytoplasme plus ou moins étroit et régulier qui entoure ce noyau et que nous avons observé très fréquemment en fluorescence ? S'agit-il de plasmoblaste ou de lymphocyte ?

Il est difficile de se prononcer car les recolorations par les colorants cytologiques usuels donnent souvent des résultats médiocres, même après essai de dissociation des complexes antigène-anticorps. Le marquage par un antisérum conjugué à un fluorochrome à pH alcalin et les essais de dissociation des complexes immunologiques en pH acide modifient les affinitées tinctoriales des cytoplasmes et des noyaux, or on sait combien il peut être difficile, même en respectant scrupuleusement les conditions techniques de préciser les éléments blastiques monocytaires ou lymphoplasmocytaires.

Dans certains cas, nous pensons pouvoir affirmer, en nous basant essentiellement sur la taille de la cellule et le rapport nucléo-cytoplasmique qu'il s'agit de lymphocytes ; mais le nombre des lymphocytes qui nous paraissent certains n'est pas très élevé. Il pourrait s'agir le plus souvent de cellules intermédiaires. il a été montré en effet, récemment, que certains lymphocytes pourraient après stimulation antigénique ou par l'action de la phytohémagglutinine se transformer en grandes cellules pyroninophiles immatures de la lignée plasmocytaire.

Dans les ganglions de macroglobulinémie, la plupart des cellules rendues fluorescentes par les anticorps anti IgM globuline et parfois par les anticorps anti IgG globuline ressemblent à des grands lymphocytes. S'agit-il réellement de lymphocytes ou de plasmocytes lymphoïdes tels que les a décrit Braunsteiner [15, 16].

Seule une étude en microscopie électronique avec des anticorps marqués à la ferritine permettrait peut-être de répondre à cette question. Mais déjà les expériences de Zucker et Franklin [118] en culture de tissu utilisant des isotopes radioactifs et des anticorps fluorescents ont confirmé la formation de macroglobuline par des lymphocytes jeunes et des lymphoblastes. La présence de lamelles endoplasmiques à surface rugueuse observées au microscope électronique évoque bien l'aspect des cellules engagées dans une synthèse et une sécrétion protéique.

A côté des plasmocytes typiques et des cellules lymphocytaires, nous avons constaté la présence d'immunoglobulines dans de grandes cellules à cytoplasme irrégulier, cellules réticulaires vraisemblablement. Les travaux de Fagraeus [40] ont bien mis en évidence le rôle de ces cellules et en particulier la formation d'anticorps parallèlement à la transformation des cellules réticulaires en plasmocytes.

Coons [30, 31] Nossal [79, 80, 81] et Attardi [6] avec des cellules isolées ont également montré que la principale source d'anticorps chez le lapin était la cellule réticulo-plasmocytaire immature. Il en est vraisemblablement de même chez l'homme.

II. Si on sait que les petits plasmocytes mûrs ne fixent pas en général les anticorps fluorescents, il n'en reste pas moins que nombre de cellules lympho-plasmocytaires jeunes ne fixent pas non plus les anticorps fluorescents, en particulier certains plasmocytes myélomateux.

Ces cellules n'auraient-elles pas la propriété de synthétiser des immunoglobulines ? Elles conserveraient l'aspect morphologique du plasmocyte, mais non sa fonction. Aucun argument ne nous permet de confirmer cette hypothèse. Si elle peut être envisagée dans les cas pathologiques, les plasmocytes du myélome étant des cellules proliférantes dont certaines gardent une morphologie assez voisine de la normale et dont d'autres ont tous les attributs de la malignité, elle est difficile à admettre dans les cas normaux. On peut dès lors se demander si les plasmocytes ne synthétisent pas d'autres protéines que les immunoglobulines.

En 1959 Espinosa [38] a mis en évidence la production d'une α_2 globuline par le tissu splénique du rat. Asofsky et Thorbecke [5] en 1961 ont montré par l'incorporation d'un précurseur radioactif, la synthèse de la β_1A 1C globuline dans le tissu lymphoïde humain. En appliquant les techniques d'immunofluorescence Sordat et Burtin [104] ont révélé la présence d'α_2 macroglobuline dans des plasmocytes de la moelle osseuse et de la rate humaine, ces plasmocytes pouvant être juxtaposés aux cellules marquées par les anticorps anti immunoglobulines ou dans des zones différentes, mais étant toujours bien individualisées.

Ces observations s'accordent avec le fait que certains plasmocytes ont un ergastoplasme bien développé comme le montrent les images en microscopie électronique donc en état de synthétiser activement des immunoglobulines que nous n'avons cependant pu mettre en évidence par les techniques d'immunofluorescence.

Aussi intéressant que soit les résultats obtenus avec l'α_2 macroglobuline, on ne peut en exagérer l'importance, ces cellules sont loin de représenter la totalité des plasmocytes ne contenant pas d'immunoglobulines.

III. Les plasmocytes peuvent avoir avant l'observation excrété les protéines qu'ils ont synthétisées. Cette conception pourrait expliquer que les plasmocytes mûrs au cytoplasme basophile et apparemment homogène sont exceptionnellement fluorescents contrairement aux cellules plus jeunes au cytoplasme granuleux. Fagraeus [39-40] avait déjà signalé que c'est au moment où le nombre des plasmocytes immatures est le plus élevé que l'on constate la présence d'anticorps circulant en plus grande quantité. En 1951 Moeschlin et coll. [78] ont observé que dans les processus d'immunisation l'élévation du taux des globulines sériques et l'apparition des anticorps coïncidaient avec le développement de granulations protéiques dans le cytoplasme des cellules réticulaires ; lorsque ces cellules étaient devenues des plasmocytes adultes et ne contenaient plus de granulations, le taux des anticorps cessait de s'élever.

Ce seraient des vésicules ergastoplasmiques plus ou moins dilatées par les protéines que la cellule synthétise qui expliqueraient les granulations que nous avons presque toujours trouvées dans les plasmocytes fluorescents. L'action de la ribonucléase nous semble un argument en faveur de cette hypothèse.

IV. La spécificité de synthèse cellulaire est presque absolue. Les cellules observées ne contiennent, en règle, qu'une seule immunoglobuline ou un seul type de chaînes légères, ce qui semble indiquer qu'à un moment donné tout au moins, une cellule ne peut produire à la fois, les différents types de chaînes légères et de chaînes lourdes mais qu'elle synthétise par contre les chaînes polypeptidiques L et H entrant dans la constitution d'une même immunoglobuline. Le fait de trouver côte à côte sur un frottis marqué des cellules ne renfermant que la chaîne légère étudiée ou que la chaîne lourde de l'immunoglobuline recherchée, γ par exemple, suggère que cette chaîne légère isolée correspond à une autre des immunoglobuline β_2A ou β_2M et la chaîne lourde isolée serait vraisemblablement associée à l'autre type de chaînes légères. Les limites actuelles de la technique qui n'emploie que deux fluorochromes différents ne nous permettent pas de vérifier cette hypothèse très vraisemblable cependant, au moins dans les cas normaux.

Nous avons constaté la présence simultanée des deux types de chaînes constituant une immunoglobuline dans une seule cellule avec un renforcement périnucléaire de l'intensité du marquage. Ce renforcement périnucléaire est dû essentiellement aux chaînes légères alors que les chaînes lourdes prédominent dans la région périphérique au moins chez l'adulte dans les cas normaux ou ne présentant que des anomalies inflammatoires banales. Il est très possible que cet aspect corresponde à un accroissement de synthèse dans la région périnucléaire siège du corps de Golgi et zone de réticulum endoplasmique très développé, aspect évocateur d'une zone d'activité maxima [17].

Certes cette image de renforcement périnucléaire pourrait être le résultat d'un artefact dû à l'étalement de la cellule. Sans pouvoir éliminer formellement cette hypothèse dans tous les cas, un certain nombre d'observation nous permettent de ne pas la retenir. En effet, nous avons pu quelquefois vérifier le marquage de cette région uniquement après la fixation du deuxième antisérum dirigé contre la structure commune. Le mélange des deux types de chaînes et le maximum des chaînes lourdes à la périphérie correspond peut-être à l'ordre de synthèse. On retrouverait ici cette analogie si souvent envisagée entre le plasmocyte et la cellule glandulaire. La protéine prête à être excrétée, ici l'immunoglobuline complète, se situe au pôle apicale de la cellule.

Ce n'est que de façon exceptionnelle que nous avons observé deux immunoglobulines dans une même cellule, ou les deux types de chaînes légères. Nos résultats rejoignent en cela ceux de Mellors et Korngold [75], Solomon et coll. [102], mais semblent en contradiction avec ceux de Nossal et coll. [82] qui ont trouvé chez des animaux récemment immunisés une synthèse de deux types d'anticorps différents 19 S et 7 S, donc appartenant à deux immunoglobulines, par un certain nombre de cellules, environ 15 % des cellules étudiées. Pour nous les cellules contenant deux immunoglobulines sont en proportion nettement moindre, vraisemblablement inférieure à 1 %, mais il ne faut pas oublier qu'il s'agit de conditions différentes ; Nossal

[82] a étudié des cellules provenant d'animaux hyperimmunisés contre un antigène bien défini : flagelle de Salmonella donnant en réponse un anticorps de deux types différents ; il a observé ces cellules au maximum de la production d'anticorps après les avoir sélectionné par adhérence bactérienne, alors que nous avons étudié des organes humains prélevés chirurgicalement sans stimulation antigénique préalable, la plupart des cellules observées chez l'adulte ont vraisemblablement acquis leur type de synthèse définitif d'anticorps 7 S appartenant aux γ G globulines et il n'est pas possible de savoir si elles n'ont pas synthétisé antérieurement des anticorps 19S.

V. Si la spécificité de synthèse cellulaire reste absolue chez le fœtus et le jeune enfant le maximum du type d'immunoglobulines synthétisé est inversé.

Nous avons constaté la présence de cellules à β_2M globuline en nombre nettement plus élevé que celui des cellules à γ globulines dans la rate des fœtus très jeunes. Progressivement le nombre des cellules à γ globulines s'accroît au cours de la vie intra-utérine pour atteindre un nombre à peu près aussi important que celui observé dans une rate d'adulte normal. Par contre le nombre des cellules à β_2M paraît toujours beaucoup plus important même chez le très jeune enfant. Ceci est en accord avec les nombreuses observations qui ont établi que les premiers anticorps synthétisés étaient des anticorps lourds donc du type β_2M.

Nos résultats rejoignent ceux de van Furth [50], également pour le foie ; comme lui nous n'avons pas trouvé de cellules immunocompétentes, mais nous savons que cet organe est surtout érythroblastique et qu'il est rapidement suppléé par la rate et les ganglions.

Il est difficile d'expliquer l'absence de cellules fluorescentes dans le thymus alors que de nombreux auteurs ont montré le rôle important de cet organe dans le développement des réactions immunitaires. Miller [77] et Archer [2] Arnason et Waksman [3] ont montré que les animaux thymectomisés à la naissance présentaient une atrophie du tissu lymphoïde et une déficience immunologique. Le thymus serait la source primaire et quasi exclusive des cellules immunologiques. Comment dès lors expliquer que l'on n'y décèle jamais ou presque de traces d'immunoglobulines. Il est possible que nos techniques ne soient pas suffisamment sensibles ou que les cellules thymiques ne soient que des précurseurs qui iront ensuite coloniser les différents tissus lymphoïdes au sein desquels elles puiseraient, au contact d'autres cellules quelque chose qui leur permettrait d'acquérir leur compétence immunologique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

A l'aide des techniques d'immunofluorescence nous avons étudié l'origine cellulaire des immunoglobulines.

1. Nous avons trouvé les trois immunoglobulines (γG, γA, γM globuline) en règle séparément dans des cellules morphologiquement identiques : cellules jeunes lymphoplasmocytaires, plasmocytes typiques, plus rarement lymphocyte.

2. Bien qu'il y ait dans la très grande majorité des cas une seule immunoglobuline par cellule, nous avons observé quelques rares cas de mélange IgG globulines IgA globuline et IgG globuline IgM globuline.

3. Les chaînes légères et lourdes d'une même immunoglobuline sont formées dans une même cellule. Il est possible que dans le cytoplasme de la cellule immunologiquement compétente existe deux populations de granulations à spécialisation différente.

4. Les anticorps anti-chaînes légères K (I) et λ (II) se fixent sur des cellules différentes de même morphologie groupées en amas ou côte à côte dans des mêmes zones lymphoïdes.

Il est exceptionnel d'observer les deux types de chaînes légères dans une même cellule.

Le rapport des cellules type I ou type II varie d'un prélèvement à l'autre d'un individu à l'autre. Nous n'avons pas retrouvé le rapport 1/3, 2/3 des deux types de γ globulines sériques.

Le troisième type de chaînes légères a été mis en évidence dans un petit nombre de cellules ganglionnaires et médullaires.

5. Tous les plasmocytes ne fixent pas les anticorps fluorescents, le problème de la synthèse d'autre globuline est envisagé.

6. Les résultats obtenus chez le fœtus et le jeune enfant montrent une plus grande fréquence de cellules à IgM globuline qu'à IgG globulines contrairement à l'adulte et l'absence d'IgA globuline. Ces résultats sont en accord avec l'apparition plus précoce des anticorps 19 S dans le développement des réactions immunitaires.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Andersen H. C., Bing J. — Further studies on the importance of plasma cells in the formation of globulin. *Acta Path. et Microb. Scandinav.*, 1944, **21**, 455.
2. Archer O., Pierce J. C. — Role of thymus in development of the immune reponse. *Fed. Proc.*, 1961, **20**, 26 (abstract.).
3. Arnason B. G., Jankovic B. D. and Waksmann B. H. — A survey of the thymus and its relation to lymphocytes and immune reactions. *Blood*, 1962, **20**, 617.
4. Askonas B. A., Humphrey J. H., Porter R. R. — On the origin of the multiple forms of rabbit γ globulin. *Biochem. J.*, 1956, **63**, 412.
5. Asofsky R. and Thorbecke G. J. — Sites of formation of immunoglobulins and of a component of C'3 II. Production of immunoelectrophoretically identified serum proteins by human and monkey tissus *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 1961, **114**, 471.
6. Attardi G., Cohn M., Horibata K., Lennox E. S. — On the analysis of antibody formation at the cellular level. *Bact. Rev.*, 1959, **23**, 213.
7. Bernard J. — Maladies du sang et des organes hématopoïétiques. Ed. Médicales Flammarion, 1951, p. 32 c.
8. Bernier G. M., Cebra J. J. — Polypeptide chains of humain γ globulin : cellular localization by fluorescent antibody. *Science*, 1964, **144**, 1590.
9. Bing J., Plum P. — Serum proteins in leucopenia. *Acta Med. Scandinav.*, 1937, **92**, 415.
10. Bing J. — Further investigations on hyperglobulinemia. *Acta Med. Scandinav.*, 1940, **103**, 547.

11. Bing J. and Christensen N. O. — The connection between plasma cells and the occurrence of hyperglobulinemia in horses and cattle. *Acta Med. Scandinav.*, 1944, **116**, 382.
12. Bjorneboe M., Gormsen H. — Experimental studies on the role of plasma cells as antibody producers. *Acta path. et Micro. Scandinav.*, 1943, **20**, 649.
13. Bjorneboe M., Gormsen H., Lundquist F. — Further experimental studies on the role of the plasma cells as antibody producers. *J. of Immunol.*, 1947, **55**, 121.
14. Blanc B. — Les protéines du lactosérum leurs relations avec l'immunité et le métabolisme du fer. Lausanne, 1962.
15. Braunsteiner H., Fellinger K., Pakesch F. — Demonstration of a cytoplasmic structure in plasma cells. *Blood*, 1953, **8**, 916.
16. Braunsteiner H., Fellinger K. et Pakesch F. — Electron microscopic investigations on lymph nodes and bone marrow in malignant blood diseases. *Blood*, 1957, **12**, 278.
17. Buffe D., Burtin P., Grabar P. — Localisation intracellulaire des chaînes légères et des chaînes lourdes des γ globulines. *C. R. Acad. Sciences*, 1964, **258**, 4629.
18. Burtin P., Hartmann L., Fauvert R., Grabar P. — Etudes sur les protéines du myélome. I. Etude critique des techniques d'identification de la protéine de Bence-Jones et leur valeur diagnostique. *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.*, 1956, **1**, 18.
19. Burtin P. — Mise en évidence des déterminants antigéniques des γ globulines normales portés par les protéines de Bence-Jones. *C. R. Acad. Sc.*, 1960, **251**, 1250.
20. Burtin, P. — Etudes immunologiques sur la structure antigénique des γ globulines humaines. I. Renseignements fournis par l'hydrolyse enzymatique ménagée des γ globulines. Proc. 8th Colloq. « Protides of the Biological Fluids » Elsevier Publ. Amsterdam 1961, p. 119.
21. Burtin P. — Etudes immunologiques sur la structure antigénique des γ globulines humaines II. Dénombrement et répartition des déterminants antigéniques des γ globulines humaines. Proc. 9th Colloq. « Protides of the Biological Fluids » Elsevier Publ., Amsterdam, 1962, p. 292.
22. Burtin P. — A third antigenic type of human γ globulins. *Nature*, 1964, **202**, 1019.
23. Burtin P. et Buffe D. — Etudes en immunofluorescence des plasmocytes humains de γ et β_2A myélomes. *Path. Biol.*, 1964, **12**, 5.
24. Burtin P. et Buffe D. — Immunofluorescent studies of human plasma cells in γ and and β_2 A. myelomas. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1963, **114**, 171.
25. Cardon L., Atlas D. — Incidence and causes of hyperproteinemia. *Arch. Int. Med.*, 1943, **71**, 377.
26. Casperson T., Landstrom-Hyden H. and Aquilonious L. — Cytoplasmanukleotide in Eiweissproduzierenden Drüsenzellen Chromosoma, 1941, **2**, 111.
27. Chiappino G., Pernis B. — Demonstration with immunofluorescence of 19 S macroglobulins and 7 S gammaglobulins in different cells of the human spleen. *Path. Microbiol.*, 1964, **27**, 8.
28. Cohn M. — Production of antibodies in experimental animals. *Methods in medical research*, 1952, **5**, 271. (Ed. by Corcoran A. C.) The Year Book Publischers Chicago.
29. Coons A. H., Creech H. J., Jones R. N. et Berliner E. — The demonstration of pneumococcal antigen in tissus by the use of fluorescent antibody. *J. of Immunol.*, 1942, **45**, 159.
30. Coons A. H., Kaplan M. H. — Localization of antigen in tissue cells II Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, 1950, **91**, 1.
31. Coons AH., Leduc E. H., Conolly J. M. — Studies on antibody production I A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.*, 1955, **102**, 49.
32. Deutsch H. F. et Morton J. I. — Dissociation of human serum macroglobulins. *Sciences*, 1957, **125**, 600.
33. Edelman G. M. — Dissociation of γ globulins. *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, **81**, 3155.

34. Edelman G. M. et Poulik M. D. — Study on structural units of the γ globulins. *J. Exp. Med.*, 1961, **113**, 861.
35. Edelman G. M. et Benacerraf B. — On structural and functional relations between antibodies and proteins of the γ system. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1962, **48**, 1035.
36. Edelman G. M. and Gally J. A. — The nature Bences-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptides chains of myeloma globulins and normal γ globulins. *J. Exp. Med.*, 1962, **116**, 207.
37. Edelmann G. M., Olins D. E., Gally J. A., Zinder N. D. — Reconstitution of immunologic activity by interactions of polypeptide chains of antibody. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1963, **50**, 753.
38. Espinosa E. — Production of α and γ globulins by the isolated and perfused rat spleen. *Nature*, 1959, **184**, 1801.
39. Fagraeus A. — Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies *in vitro*. *Nature*, 1947, **159**, 499.
40. Fagraeus A. — Antibody production in relation to the development of plasma cells. *In vivo* and *in vitro* experiments. Stockholm 1948. *Acta Med. Scand.* suppl. 204.
41. Fahey J. L. — Heterogeneity of gamma globulins. *Advan. Immunol. ed. by Taliaferro W. H. and Humphrey J. H.*, 1962, **2**, 41, Acad. Press New York/London.
42. Fahey J. L. — Two types of 6,6 S γ globulins β_2A globulin, 18 S γ_1 macroglobulins in normal serum and γ macroglobulins in normal urine. *J. Immunol.*, 1963, **91**, 438.
43. Fahey J. L. — Preparation of antisera specific for 6,6 S gammaglobulins β_2A globulins, γ_1 macroglobulins and for type I and II common gammaglobulin determinants. *J. Immunol.*, 1963, **91**, 484.
44. Franek F. and Nezlin R. S. — Recorvery of antibody by interaction of different peptides chains isolated from purified horse antitoxin. *Folia. Microbiol.*, 1963, **8**, 128.
45. Franklin E. C. — Structural units of human 7S gammaglobulins. *J. Clin. Invest.*, 1960, **39**, 1933.
46. Franklin E. C. et Kunkel H. G. — Immunologic differences between the 19 S and 7 S components of normal human γ globulins. *J. Immunol.*, 1957, **78**, 11.
47. Franklin E. C. et Stanworth D. R. — Antigenic relationships between immune globulins and certain related paraproteins in man. *J. Exp. Med.*, 1961, **114**, 521.
48. Franklin E. C., Stanworth D. R. — Studies on the antigenic specificity of human 7 S gammaglobulin. *Fed. Proc.*, 1961, **20**, 31.
49. Franklin E. C., Fudenberg G. H., Meltzer M. and Stanworth D. R. — The structural basis for genetic variations of normal human γ globulin. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1962, **48**, 914.
50. Furth (van) R. — The formation of immunoglobulins by human tissues *in vitro* 1964 Printed by « Luctor et Emergo » Leiden.
51. Gitlin D., Hitzig W., Janeway Ch. — Multiple serum protein deficiences in congenital and acquired agammaglobulinemia. *J. Clin. Invest.*, 1956, **35**, 1199.
52. Goldstein G., Slyzys I. S., Chaze M. W. — Studies on fluorescent antibody staining I Non specific fluorescence with fluorescein coupled sheep anti rabbit globulins. *J. Exp. Med.*, 1961, **114**, 89.
53. Good R. A. — Studies on agammaglobulinemia II. failure of plasma cell formation in the bone marrow and lymph nodes of patients with agammaglobulinemia. *J. Lab. and Clin. Med.*, 1955, **46**, 167.
54. Grabar P., Williams C. A. — Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Applications au sérum sanguin. *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
55. Grabar (Madame). — Cité dans le « Cours d'Immunologie Générale et de Sérologie » de l'Institut Pasteur. Edition 1964.
56. Grubb R. — The existence of human serum groups. *Acta Path Microbiol., Scand.*, 1956, **39**, 195.
57. Grubb R., Laurell A. B. — Hereditary serological human serum groups. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1956, **39**, 390.

58. Heremans J. F. — Immunochemical studies on protein pathology, the immunoglobulin concept. *Clin. Chim. Acta* 1959, **4**, 639.
59. Heremans J. — Les globulines sériques du système gamma, leur nature et leur pathologie. Editions Arscia S. A. Bruxelles et Masson et Cie Paris, 1960.
60. Hirsch-Marie H. et Burtin P. — Etude électrophorétique et immunochimique des protéines du liquide gastrique normal. *Rev. Fse. Et. Clin. et Biol.*, 1963, **2**, 145.
61. Kagan B. N. — Hyperglobulinemia. *Am. J. M. Sc.*, 1943, **206**, 309.
62. Korngold L. and Lipari R. — Multiple myeloma protein III The antigenic relationship of Bence-Jones proteins to normal γ globulin and multiple myeloma serum proteins. *Cancer*, 1956, **9**, 262.
63. Kunkel H. G. and Ward S. M. — The immunological determination of human albumin in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, 1950, **182**, 597.
64. Lane S. L. — Plasmocytoma of the mandible. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path.*, 1952, **5**, 434.
65. Leduc EH., Coons A. H., Conolly J. M. — Studies on antibody production II. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit. *J. Exp. Med.*, 1955, **102**, 61.
66. Leder P. et Gokcen M. — Cytoplasmic localization of macroglobulin in lymphocytoid marrow cells in macroglobulinemia of Waldenström. *J. Clin. Invest.*, 1962, **41**, 1377.
67. Levene H. I., Franklin E. C., Thorbecke G. J. — *In vitro* formation of 7 S and 19 S γ globulins by tissues from normal subjects and patients with rheumatoïd arthritis. *J. Immunol.*, 1961, **86**, 440.
68. Levy H. B. and Sober H. A. — A simple chromatographic method for preparation of gammaglobulin. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1960, **103**, 250.
69. Martin C. M., Waite J. B. and Mc Coullough N. B. — Antibody protein synthesis by lymph nodes homotransplanted to a hypogammaglobulinemic adult. *J. Clin. Inv.*, 1957, **36**, 405.
70. Mc Master P. D., Hudack S. S. — The formation of agglutinins within lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 1935, **61**, 783.
71. Magnus-Levy A. — Multiple myelome. VIII. Euglobulinämia. Zur Klinik and Pathologie. Amyloïdosis. *Ztsch. Fklin Med.*, 1933/34, **126**, 62.
72. Mannik M. and Kunkel H. G. — Classification of myeloma proteins, Bence-Jones proteins and macroglobulins into two groups on the basis of common antigenic characters. *J. Exp. Med.*, 1962, **116**, 859.
73. Mannik M. and Kunkel H. G. — Two major types of normal 7 S γ globulins. *J. Exp. Med.*, 1963, **117**, 213.
74. Mannik M. and Kunkel H. G. — Localization in groupe I and groupe II γ globulins. *J. Exp. Med.*, 1963, **118**, 817.
75. Mellors R. C. and Korngold L. — The cellular origin of human immunoglobulins. *J. Exp. Med.*, 1963, **118**, 387.
76. Metzger H., Singer S. J. — Binding capacity of reductively fragmented antibodies to the 2.4. dinitrophenyl group. *Sciences*, 1963, **142**, 674.
77. Miller J. F. — Immunological function of the thymus. *Lancet*, 1961, **2**, 748.
78. Moeschlin et Coll. — Beitrag zur morphologie der reticuloendothelialen Zellen des intravitalen Lymphknotenpunktats. *Fol. Haematol.*, 1941, **65**, 181.
79. Nossal G. J. V. — Antibody production by single cells. *Brit. J. Exp. Path.*, 1958, **39**, 544.
80. Nossal G. J. V. — Antibody production by single cells. III the histology of antibody production. *Brit. J. Exp. Path.*, 1959, **40**, 118.
81. Nossal G. J. V., Mäkelä O. — Elaboration of antibodies by single cells. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1962, **16**, 53.
82. Nossal G. J. V., Szenberg, A., Ada G. L., Austin C. M. — Single cell studies on 19 S antibody production. *J. Exp. Med.*, 1964, **119**, 485.
83. Oakley C. L., Warrack G. H., Batty I. — Antibody production in transplants. *J. Path. Bact.*, 1954, **67**, 485.
84. Olins D. E., Edelman, G. M. — The antigenic structure of the polypeptide chains of human γ globulins. *J. Exp. Med.*, 1962, **116**, 635.

85. Olins D. E. and Edelman G. M. — Reconstitution of 7 S molecules from L and H polypeptide chains of antibodies and γ globulins. *J. Exp. Med.*, 1964, **119**, 789.
86. Ortega L. G. and Mellors M. D. — Cellular sites of formation of γ globulins. *J. Exp. Med.*, 1957, **106**, 627.
87. Ouchterlony O. — Antigen antibody reactions in gels. *Arkiv. Kem. Mineral Géol.*, 1948, **26**, 14.
88. Oudin J. — L'analyse immunochimique qualitative ; méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1946, **222**, 115.
89. Oudin J. — The « allotypy » of certain protein antigens of serum. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1936, **242**, 2606.
90. Oudin J. — Allotypy of rabbit serum protein II. Relationships between various allotypes : The common antigenic specificity, their distribution in a sample population, genetic implication. *J. Exp. Med.*, 1960, **112**, 107.
91. Porter R. R. — The hydrolysis of rabbit globulin and antibodies with crystalline papaïn. *Biochem. J.*, 1959, **73**, 119.
92. Putman F. W., Tan M., Lynn L. T., Easley C. W., Migita S. — The cleavage of rabbit gammaglobulins by papaïn. *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 717.
93. Rinderknecht. — A new technic for the fluorescent labelling of proteins. *Experientia*, 1960, **16**, 430.
94. Rinderknecht. — Ultra-rapid fluorescence labelling of proteins. *Nature*, 1962, **193**, 167.
95. Rohr K. — Bluteiweisskörper und Knochenmarks reticulum. *Helv. Med. Acta*, 1938, **5**, 544.
96. Ropartz L., Lenoir J., Rivat L. — A new inheritable property of human sera. The Inv factor. *Nature*, 1961, **189**, 586.
97. Sheidegger J. J., Buzzi C. — Etude immunoélectrophorétique des γ globulines. *Rev. Fran. Et. Clin. Biol*, 1957, **2**, 895.
98. Silverstein A. M. — Congenital syphilis and the timing of immunogenesis in the human foetus. *Nature*, 1962, **194**, 196.
99. Silverstein A. M. and Lukes R. J. — Fetal response to antigenic stimulus. I — Plasmacellular and lymphoïd reactions in the human fetus to intrauterine infection *Lab. Invest.*, 1962, **11**, 918.
100. Silverstein A. M., Urh J. W., Kraner K. L. — Fetal response to antigenic stimulus II Antibody production by the fetal lamb. *J. Exp. Med.*, 1963, **117**, 799.
101. Silverstein A. M., Thorbecke G. J., Kraner K. L., Lukes R. J. — Fetal response antigenic stimulus III Gammaglobulin production in normal and stimulated fetal lambs. *J. Immunol.*, 1963, **91**, 384.
102. Solomon A., Fahey J. L., Malmgren R. A. — Immuno-histological localization of γ_1 macroglobulin, β_2A myeloma proteins, 6,6 S γ myeloma proteins and Bence-Jones proteins. *Blood*, 1963, **21**, 403.
103. Sordat B. — Emploi des fluorochromes nucléaires dans la détermination de cellules marquées par les anticorps fluorescents. Exp. Cell Research, 1966, **40**, 193.
104. Sordat B. et Burtin P. — Origine cellulaire de l'α_2 macroglobuline. A paraître.
105. Thorbecke G. J., Keuning F. J. — Antibody formation *in vitro* by haemopoïetic organs after subcutaneous and intravenous immunization. *J. Immunol.*, 1953, **70**, 129.
106. Thorbecke G. J., Keuning F. J. — Antibody and gamma-globulins formation *in vitro* in haemopoïetic organs. *J. Inf. Diseases*, 1956, **63**, 157.
107. Thorbecke G. J. — Gamma globulins and antibody formation *in vitro*. I. gammaglobulin formation in tissues from immature and normal adult rabbits. *J. Exp. Med.*, 1960, **112**, 279.
108. Thorbecke G. J., Benaceraff B. — The reticulo endothelial system and immunological phenomena. *Progress Allergy*, 1962, **6**, 559.
109. Tiselius A. and Kabat E. A. — An electrophoretic study of immune sera purified antibody preparations. *J. Exp. Med.*, 1939, **69**, 119.

110. Uehlecke A. — Neue Möglichtkeiten zur Herstellung fluoreszenz Markierter Proteine. *Z. Natürforsch,* 1958, **136**, 722.
111. Undritz E. — Die Plasmazellen im Tierreich und ihre anzunehmende Bedeutung als Drusenzellen. *Helvet. Med. Acta,* 1938, **5**, 548.
112. Waksman B. H., Arnason B. G., Jankovic B. D. — Role of the thymus in immune reactions in rats III Changes in the lymphoïd organs of thymectomized rats. *J. Exp. Med.,* 1962, **116**, 187.
113. West C. D., Hong R., Holland N. H. — Immunoglobulin levels from the new born period to adult-hood and in immunoglobulin deficiency states. *J. Clin. Invest.,* 1962, **41**, 2054.
114. White R. G., Coons A. H. et Conolly J. M. — Study an antibody production. IV. The role of a wax fraction of mycobacterium tuberculosis in adjuvant emulsions on the production of antibody to egg albumin. *J. Exp. Med.,* 1955, **102**, 83.
115. Williams C. A. et Grabar P. — Immunoelectrophoretic studies on serum proteins. I. The antigens of human serum. *J. Immunol.,* 1955, **74**, 158.
116. Wuhrmann F., Leuthardt F. — Takata, Reaktion und Bluteiweissfraktionen. *Klin Wchnschr.,* 1938, **17**, 409.
117. Zak et Good. — Immunochemical studies of human gamma globulins. *J. Clin. Invest.,* 1959, **38**, 579.
118. Zucker-Franklin D., Franklin E. C. and Cooper N. S. — Production of macroglobulins *in vitro* and a study of their cellular origin. *Blood,* 1962, **20**, 56.

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

Les immunoglobines et les groupes Gm. dans les myélomes

Vu et approuvé :

Paris, le 26 Juin 1967.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Marc ZAMANSKY.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE.

Achevé d'imprimer le 15 septembre 1967.

M. Declume, Imprimeur, Lons-le-Saunier. — 578-67-200.
Septembre 1967 « Dépôt légal 3e trimestre 1967 — N° 5896 ».

Printed in France.